Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik,
Klinik A, der Universität Düsseldorf

(Direktor: Prof. Dr. W. Schneider)

VERHALTEN VON ADENOSIN UND SEINEN DERIVATEN IM BLUT TERMINAL NIERENINSUFFIZIENTER PATIENTEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Beate Ulrike LORENZ

aus Düsseldorf

~~1981~~
1983

UNIV. ABERDEEN LIBR.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543909_0044

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik,
Klinik A, der Universität Düsseldorf

(Direktor: Prof. Dr. W. Schneider)

VERHALTEN VON ADENOSIN UND SEINEN DERIVATEN IM BLUT TERMINAL NIERENINSUFFIZIENTER PATIENTEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Beate Ulrike LORENZ

aus Düsseldorf

1981

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
Professor Dr. G. Arnold

Referent
Professor Dr. W. Schneider

Korreferent
Professor Dr. G. Arnold

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet.

I N H A L T S - V E R Z E I C H N I S

		Seite
	ABKÜRZUNGS-VERZEICHNIS	V
I.	EINLEITUNG	1
II.	AUFGABENSTELLUNG	7
III.	METHODIK	
	1. Probanden	8
	2. Blutgewinnung	13
	3. Vorbereitung der Proben zur Dünnschicht- und Säulen-Chromatographie	14
	4. Nachweis und semi-quantitative Bestimmung von ATP und dATP mit der Dünnschicht-Chromatographie	18
	5. Auftrennung in oxy- und desoxy-Nukleotide mit der Säulen-Chromatographie	23
	6. Enzymatische Bestimmung von ATP und dATP mit der Phosphoglycerat-Kinase Methode	31
	7. Enzymatische Bestimmung von ATP und dATP mit der Luciferin-Luciferase Methode	42
	8. Gewinnung und Vorbereitung des Probenmaterials zur Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	43
	9. Quantitative Bestimmung von Adenosin und desoxy-Adenosin sowie Analyse der Nukleoside und Nukleinsäure-Basen mit der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	48
	10. Verwendete Chemikalien	51
	11. Statistische Auswertung	54

		Seite
IV.	ERGEBNISSE	
	1. Hämatologische und klinisch-chemische Daten	55
	2. Adenosin-Bestimmung mit der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	64
	3. Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatogramme	68
	4. Dünnschicht-Chromatographie	70
	5. Säulen-Chromatographie	71
	6. ATP-Bestimmung mit der Phosphoglycerat-Kinase Methode	72
	7. ATP-Bestimmung mit der Luciferin-Luciferase Methode	77
	8. Vergleich der ATP-Werte von Phosphoglycerat-Kinase Methode und Luciferin-Luciferase Methode	82
	9. Rechnerische Analyse (Korrelationen)	86
V.	DISKUSSION	87
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	94
VII.	LITERATUR-VERZEICHNIS	96
VIII.	LEBENSLAUF	104

A B K Ü R Z U N G S - V E R Z E I C H N I S

Masseinheiten

λ	Wellenlänge des Lichts in nm
m	Meter
cm	Zentimeter
g	Gramm
mol (Mol)	Molekulargewicht in g
val (Val)	Äquivalentgewicht in g
Std	Stunde
min	Minute
Upm	Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunde
l	Liter
v/v	Volumen/Volumen
^{o}C	Grad Celsius
Ci	Curie
m	milli (10^{-3})
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
p	pico (10^{-12})
$>$	grösser als
$<$	kleiner als
$\sim$	ungefähr

Konzentrationseinheiten

M	einmolare Lösung (ein mol eines gelösten Stoffes in 1000 ml Gesamtlösung)
N	einnormale Lösung (ein val eines gelösten Stoffes in 1000 ml Gesamtlösung)

Genus

♀	feminin
♂	maskulin

Verfahren

HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
LL	Luciferin-Luciferase
PGK	Phosphoglycerat-Kinase

Allgemeine Abkürzungen

abds	abends
ak	akut
anorgan	anorganisch
b B	bei Bedarf
bidest	bidestillatus, a, um
c	Konzentration
Cat	Catalogue
chron	chronisch
diab	diabetisch
Diab	Diabetes
dial	dialysiert
⌀ dial	nicht dialysiert
ΔE	Extinktionsdifferenz
Erys	Erythrozyten
Eryzahl	Erythrozytenzahl
Fa	Firma
Ges	gesunde Kontrollgruppe
Hb	Hämoglobin
Hk (Hkt)	Hämatokrit
HWS	Halswirbelsäule
interst	interstitiell
juv	juvenil
KHK	koronare Herzerkrankung
Konz	Konzentration
krist	kristallisiert
Leuko	Leukozytenzahl
li	links
Lsg	Lösung

MCH	mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
mind	mindestens
o g	obengenannt
p	Signifikanzniveau
p A	pro analysi
Pat	Patienten
r	Korrelationskoeffizient
re	rechts
s	siehe
term	terminal
ton-klon	tonisch-klonisch
UV	ultraviolett
V a	Verdacht auf
Z n	Zustand nach

Spezielle Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
APRT	Adenin-Phosphoribosyl-Transferase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
dATP	desoxyATP
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-äthansulfonsäure
ITP	Inosintriphosphat
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
$NADH_2$	reduziertes NAD
PCA	Perchlorsäure
PEI	Polyäthylenimin
Pho	Phosphat
PPi	Pyrophosphat

$$Rf = \frac{\text{Entfernung des Fleckmittelpunktes vom Startpunkt}}{\text{Entfernung der Fliessmittelfront vom Start}}$$

I. Einleitung

Die terminale Niereninsuffizienz, die Urämie, ist nicht als alleinige Erkrankung der Niere anzusehen, sondern als ein Krankheitsbild, bei dem alle Organe des Körpers in Mitleidenschaft gezogen sind. Die strukturellen und funktionellen Veränderungen an den Organen führen zu einem breiten Spektrum von Symptomen bei urämischen Patienten (GESSLER et al. 1976, SIEBERT 1977).

Organveränderungen und Symptome in der Urämie Tab. 1

Niere	
Retention harnpflichtiger Substanzen	Anstieg harnpflichtiger Substanzen im Blut, Foetor uraemicus
Störungen im Wasserhaushalt	Ödembildung, Hypertonie
Elektrolyt-Störungen	Erhöhung von Kalium und anorg. Phosphat im Serum
Störungen im Säure-Basen-Haushalt	metabolische Acidose, evtl. Kussmaul'sche Atmung
verminderte Erythropoietin-Bildung	Anämie
verminderte Bildung von 1,25-Dihydroxy-cholecalciferol = Vitamin D-Hormon	verminderte Calcium-Resorption im Darm, verminderter Calcium-Einbau in Knochen
Blutzell-System	
Erythropoese-Störung gesteigerte Hämolyse	Anämie
Thrombopoese-Störung	Thrombopenie
Thrombozyten-Funktionsstörung	Haemostasestörung
Herz-Kreislauf-System	
Myocardhypertrophie	Herzinsuffizienz
Herzrhythmus-Störungen	Herzinsuffizienz, Infarkt
Pericarditis	Herzinsuffizienz
Gefässverkalkungen	Hypertonie, Durchblutungsstörungen

Lunge	
fluid lung, Lungenödem	Hypoxidose und Hyperkapnie
Gastro-Intestinal-System	
Stomatitis, Pharyngitis, Gastritis, Enteritis	Gewichtsabnahme, Übelkeit, Erbrechen
Ulcera	intestinale Blutungen, Eisenverlust, nachfolgend Anämie
Pankreatitis	Peritonitis, Ileus
verminderte Calcium-Resorption	sekundärer Hyperparathyreoidismus
reaktive Hepatitis	plasmatische Gerinnungsstörungen, Stoffwechselstörungen s.u.
Knochen	
renale Osteopathie	Knochenschmerzen, Frakturen
Immun-System	
Immunosuppression, bes. der B- u. T-Lymphozyten	verminderte Infekt-Resistenz
Nervensystem	
hypertonisch azotämische Encephalopathie, Hirnödem	motorische Unruhe, Kopfschmerzen, Psychosen, Konzentrationsschwäche, Somnolenz bis Koma, ton.-klon. Krampfanfälle Hirninfarkt
Polyneuropathie	Muskelschwäche, Lähmungen, Muskelfibrillieren
Haut	
Proliferationshemmung	Wundheilungsstörungen
?	Exantheme, Ekzeme, Pruritus
Ablagerung von Urochromen	schmutzig gelbes Kolorit
Gerinnungsstörungen	Purpura
Schilddrüse	
Unterfunktion	z.B. trockene Haut, struppiges Haar

Parathyreoidea	
Überfunktion	Entkalkung der Knochen, intestinale Ulcera
Stoffwechsel	
herabgesetzter Glukose-Stoffwechsel	verminderte Glukosetoleranz (Pseudodiabetes)
gestörter Fettstoffwechsel	z.B. erhöhte Triglyceride im Serum
Eiweiss Katabolismus	negative Stickstoff-Bilanz

Das Krankheitsbild der terminalen Niereninsuffizienz ist in seiner Pathogenese weitgehend ungeklärt. Es kann als Vergiftung durch einen endogenen Giftstoff = Toxin gedeutet werden. Dieses Toxin ist noch nicht gefunden, obwohl seit fast 200 Jahren danach gesucht wird. Eine Auswahl von bisher postulierten Toxinen ist in der nachfolgenden Tabelle 2 aufgelistet (nach GRANTHAM et al. 1978):

Auswahl bisher postulierter Urämie-Toxine Tabelle 2

Harnstoff	Natriuretisches Hormon
Kreatinin	Indole
Guanidin	"middle molecules"
Phenole	Ammoniak
Hippurat	Alkaloide
Benzoate	Aliphatische Amine
Parathormon	cAMP

Die Vielfalt der Urämie-Symptome - alle Organsysteme sind betroffen - lässt vermuten, dass das Toxin auf jede Körperzelle einwirkt. Um intrazellulären Stoffwechsel (direkt oder über ein second messenger-System) und Membranvorgänge beeinflussen zu können, muss das Toxin ein niedriges Molekulargewicht aufweisen.

Diese These vom niedrigen Molekulargewicht des Urämie-Toxins wird durch die klinische Beobachtung gestützt, wonach die Entgiftung des urämischen

Blutes über die semipermeable Dialyse-Membran, die bekanntlich nur niedermolekulare Substanzen diffundieren lässt, oft zur schlagartigen Besserung des Krankheitsbildes führt.

In der Urämie ist die Konzentration des cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) erhöht (SCHNEIDER 1978). Es ist bekannt, dass das membranständige cAMP als second messenger von Hormonen viele regulative Funktionen im Zellstoffwechsel hat (**WEISS** et al. 1975). cAMP, das extrazellulär lokalisiert ist, kann nicht die Zellmembran passieren, wie an Blutzellen aus Inkubationsversuchen von Erythrozyten bzw. Thrombozyten mit radioaktiv markiertem cAMP hervorgeht (SCHNEIDER 1978).

Das extrazelluläre cAMP wird zu Adenosin abgebaut über Enzyme, die sich an der Aussenseite der Zellmembran befinden (HILZ und KAUKEL 1973, SCHNEIDER 1976, SNYDER et al. 1976, WOLFF und COOK 1977). Adenosin stimuliert wiederum die Adenylat-Zyklase zur weiteren Bildung von cAMP (FOX und KELLEY 1978), was ein Hinweis auf eine Reaktion ist, die sich selbst verstärkt.

Adenosin ist eine niedermolekulare Substanz, die die Zellen als Urämie-Toxin beeinflussen könnte. In Tabelle 3 sind verschiedene, z.T. toxische Effekte von Adenosin aufgeführt, die teilweise nur in Zellkulturen tierischer Herkunft beobachtet wurden. Es ist möglich, dass viele dem cAMP zugeschriebenen Effekte durch Adenosin verursacht werden (PASTAN et al. 1975, SNYDER und SEEGMILLER 1976, FOX und KELLEY 1978).

Tabelle 3

Adenosin-Wirkungen (nach FOX und KELLEY 1978)

Zell-Toxizität
Immunosuppression
Veränderung der Zellstruktur
Vasodilatation
Stimulation von Hormon-Sekretion
Hemmung der Lipolyse
Potenzierung der Histamin-Freisetzung
Erhöhung des Leber-Glykogens
Erhöhung von cAMP und ATP
Hemmung der Pyrimidin-Biosynthese
Hemmung der Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Synthese
Erhöhung von S-Adenosylhomocystein
Hemmung der Nukleinsäure-Synthese
Hemmung der Thiamin-Synthese
Verminderung der Harnstoff-Synthese
Hemmung von Protein-Kinasen

Adenosin vermag - im Gegensatz zu cAMP - in die Zellen zu gelangen (BERLIN und OLIVER 1975, PATERSON et al. 1975, ROOS und PFLEGER 1972, SCHNEIDER 1976). Intrazellulär wird Adenosin zu Adenosintriphosphat (ATP) auf- bzw. zu Inosin abgebaut. Inosin wiederum kann zu GTP verstoffwechselt werden oder wird über Hypoxanthin zu Harnsäure abgebaut, die über die Niere ausgeschieden wird (s. Abb. 1).

Aufgrund der in der terminalen Niereninsuffizienz erhöhten cAMP-Spiegel (SCHNEIDER 1978) lag es nahe, auch die Spiegel von Adenosin und ATP zu bestimmen, um Aussagen über den Adenosin-Stoffwechsel zu ermöglichen.

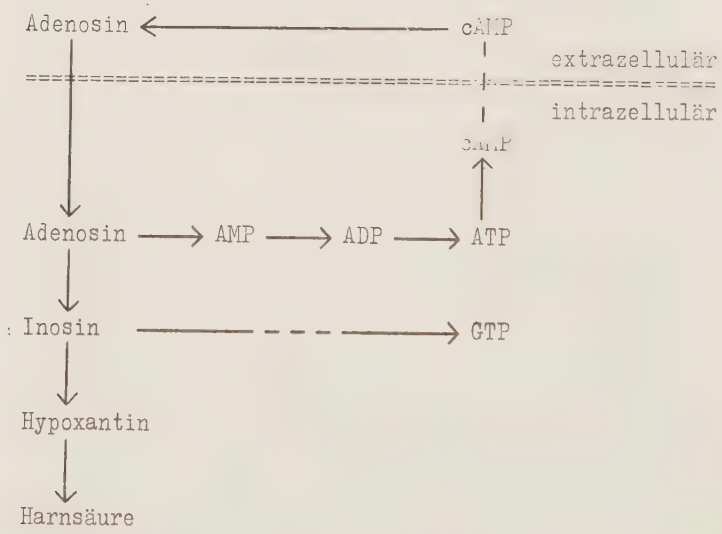
Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, ist in der Urämie u.a. eine Proliferationshemmung festzustellen, die besonders stark bei den Blutzell-Systemen ausgeprägt ist.

Diese Proliferationshemmung führt zu Veränderungen im Stoffwechsel der Substanzen, die am Kernaufbau beteiligt sind. Besonders betroffen sind also die Desoxy-ribonukleinsäure (DNA) und ihre Teilstücke wie desoxy-Nukleotide, desoxy-Nukleoside und Nukleinsäure-Basen.

Es lag nahe zu klären, ob und inwiefern diese desoxy-Substanzen die Adenosin- und ATP-Spiegel mitbestimmen.

Abbildung 1

Adenosin-Stoffwechsel



II. Aufgabenstellung

In der veränderten Stoffwechsel-Situation der Urämie werden die Spiegel von Adenosin und ATP untersucht unter Berücksichtigung der entsprechenden desoxy-Substanzen. Als Untersuchungsmaterial dienen Blutproben von terminal niereninsuffizienten Patienten sowie einem gesunden Vergleichskollektiv.

Eine Übersicht über die Verteilung von oxy- und desoxy-Adenosin sowie andere Plasma-Nukleoside sowie Nukleinsäure-Basen erfolgt mit einer Hochdruck-Flüssigkeits-chromatographischen Methode. Die Plasma-Konzentrationen von oxy- und desoxy-Adenosin werden quantitativ ermittelt.

Mit einem Dünnschicht-chromatographischen Verfahren wird untersucht, ob desoxy-ATP in Erythrozyten vorhanden ist. Zusätzlich wird ein Überblick über die Konzentrationen von oxy- und evtl. desoxy-Nukleotiden der Erythrozyten ermöglicht.

Desoxy-Nukleotide, die in grösserer Menge vorliegen, können quantitativ mittels Säulen-Chromatographie bestimmt werden.

Die Messung des ATP-Spiegels erfolgt mit einer hoch- und einer wenig-spezifischen Methode.

Die Ergebnisse der Messung mit beiden Methoden werden miteinander verglichen.

III. Methodik

1. Probanden

Blut terminal niereninsuffizienter Patienten wird untersucht. Die meisten dieser Patienten stehen in der chronischen Hämodialyse (stationär oder im "minimal care system") der Medizinischen Klinik und Poliklinik, Klinik A, Universität Düsseldorf.

Zur Hämodialyse oder -filtration werden Parallel-Fluss-Dialysatoren mit einer effektiven Membranfläche von 1,36 m^2 (lundia major 11,5 μ; Fa. Gambro) verwendet. Die Dialysatoren sind angeschlossen an Dialyse-Systeme der Firmen Braun oder Drake-Willock.

Die Daten des terminal niereninsuffizienten Kollektivs sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die Medikamente, die die Patienten einnehmen, gehen aus Tabelle 5 hervor.

Die gesunde Vergleichsgruppe besteht aus Studenten und Kliniksangehörigen. Die Daten dieser Probanden sind aus Tabelle 6 ersichtlich. Die Gruppe hat mindestens 14 Tage vor der Blutentnahme keine Medikamente mehr eingenommen. Einige gesunde Probanden konnten nicht in die Datei aufgenommen werden, da sie kurze Zeit nach der Blutentnahme die Symptome eines grippalen Infektes zeigten. So wurde das ursprüngliche Kollektiv um ein Viertel verkleinert.

Tabelle 6

Daten der gesunden Kontrollgruppe

Name	Geburtsjahr
B.S. ♀	1952
K.F. ♂	1939
L.B. ♀	1956
L.L. ♀	1956
L.F. ♂	1947
M.T. ♂	1945
M.S. ♀	1950
P.J. ♀	1953
S.S. ♀	1955
W.L. ♂	1955

Tabelle 4: Daten der terminal niereninsuffizienter Patienten

Name Geb. jahr	Grundkrankheit	Dialyse-Beginn	Frequenz u. Dauer Std/Woche	sonstige Erkrankungen
A.M. ♀ 1921	chron.Pyelonephritis	1/1977	3 x 5	-
B.C. ♀ 1933	maligne Nephrosklerose Schrumpfnieren	5/1977	3 x 5	primäre Hypertonie, KHK, Osteochondrose HWS
G.J. ♂ 1931	ak.Nierenversagen ungeklärter Genese	-	-	Diab.mel., Plantarphlegmone, Herzinfarkt 1979, Fettleber
H.H. ♂ 1940	Nephrektomie re Nierensteine li	7/1980	3 x 5	juv.Lues, Hypertonie, Herzinsuff.,chron. Proktitis, Apoplex 1978,ak. Parotitis
H.M. ♂ 1952	term.Niereninsuffizienz ungeklärter Genese	5/1979	3 x 5	Z.n.Nierentransplantatabstossung und Explantation 7/80, Hypertonie
K.D. ♂ 1954	Goodpasture-Syndrom Nephrektomie bds.	11/1977	3 x 5	Stoffwechselstörung Typ IV
K.K. ♀ 1929	chron.Glomerulonephritis Schrumpfnieren bds.	8/1979	3 x 5	Z.n.parathyreoidektomie, Z.n.Nieren-transplantatabstoss.u.Explantation 7/80
L.G. ♂ 1919	Nephrektomie li Schrumpfniere re	2/1978	3 x 5	Hypertonie
P.H. ♂ 1920	Feldnephritis V.a.Glomerulonephritis	1/1975	3 x 6	Gicht
R.H. ♂ 1923	chron.Niereninsuffizienz V.a.Glomerulonephritis	4/1980	3 x 5	-
S.B. ♀ 1924	diab.Nephropathie	-	-	Diab.mel., KHK, Hypertonie
S.K. ♂ 1914	einseitige Nephrektomie chron.interst.Nephritis	7/1980	3 x 5	Hypertonie, erhebliche Adipositas
V.M. ♀ 1962	chron.Glomerulonephritis	11/1979	3 x 5	-
W.H. ♀ 1921	chron.Pyelonephritis	6/1973	3 x 5	Herzinsuffizienz, Hypertonie

Tabelle 5

Tägliche Medikation der urämischen Patienten

	Digitoxin 0,1 mg	β-Acetyldigoxin 0,1 mg	β-Methyldigoxin 0,1 mg	Propanolol	Pindolol	Isosorbiddinitrat	Nitroglycerin 0,8 mg	Clonidin 0,15 mg	Dihydralazin 25 mg
A.M.		1 x		4 x 40 mg					
B.C.				3 x 80 mg			b.B.	3 x 300 mg	
G.J.									
H.H.	1 x					3 x 40 mg		2 x 300 mg	4 x
H.M.				3 x 40 mg					3 x
K.D.									
K.K.	1 x			3 x 40 mg		3 x 20 mg			
L.G.									4 x
P.H.		1 x					b.B.		
R.H.			1 x		1 x 15 mg	4 x 20 mg		3 x 150 mg	4 x
S.B.	1 x					3 x 20 mg		2 x 150 mg	4 x
S.K.	1 x			2 x 40 mg				1 x 300 mg	2 x
V.M.					1 x 15 mg				3 x
W.H.		1 x							1 x

Tabelle 5 (Forts.)

Tägliche Medikation der urämischen Patienten

	Reserpin 0,1 mg, Dihydralazin 10 mg	Prazosin 2 mg	Heparin	Furosemid 40 mg	Aluminiumhydroxid 440 mg	Ferro-Glykokoll-Sulfat-Komplex = 100 mg Fe-II	Vitamin-Kombination	Metoclopramid 5 mg	Laxantien
A.M.					20 x	2 x	2 x		
B.C.		3 x			6 x			b.B.	
G.J.			1 x 100mg						
H.H.					10 x				
H.M.					9 x				
K.D.						15 x			
K.K.	3 x				20 x		2 x		
L.G.	3 x				15 x				
P.H.			1 x 100mg		20 x		2 x		
R.H.				3 x	21 x		2 x		b.B.
S.B.				1 x					
S.K.				2 x	15 x				
V.M.					12 x				
W.H.					20 x		1 x		

Tabelle 5 (Forts.)

Tägliche Medikation der urämischen Patienten

	Diazepam	Phenobarbital 0,1 g	Tilidin 50 mg	Insulin	NaCl-Tabletten	Allopurinol 100 mg	Hyoszin-N-butylbromid 0,01 g Phenylbutazon 0,25 g	Hämorrhoidal-Zäpfchen	Antibiotika
A.M.					8 x 0,9 mg				X
B.C.	3 x 5 mg								
G.J.				Alt 32 E					X
H.H.							b.B.	b.B.	
H.M.									
K.D.									
K.K.									
L.G.									
P.H.						1 x			
R.H.									
S.B.				Depot 32 E					
S.K.									
V.M.									
W.H.		2 abds.	b.B.						

2. Blutgewinnung

Bei terminal niereninsuffizienten Patienten wird vor dem Anschluss an die künstliche Niere das Blut aus der arteriellen Seite des Shunt entnommen mit einer schräg angeschliffenen Edelstahl-Kanüle von 1,8 mm Innendurchmesser (Dialyse-Kanüle; Fa. Bionic).

Zur Blutentnahme wird bei terminal niereninsuffizienten Patienten, die noch nicht dialysiert werden, und bei gesunden Probanden eine Armvene punktiert mit einer schräg angeschliffenen Kanüle aus Edelstahl von 0,8 mm Innendurchmesser (Butterfly-19; Fa. Venisystems). Die Stauung vor der Punktion wird so gering wie möglich gehalten.

Je nach vorgesehener Weiterverwendung wird das Blut in unterschiedlicher Weise gesammelt:

Das Blut zur Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie wird in eine Spritze gesaugt und gleichzeitig mit gepufferter Dipyridamol-Lösung gemischt. Einzelheiten s. Methodik, Unterabschnitt 8.

Für die laborchemischen Bestimmungen wird das Blut in Glasröhrchen aufgenommen. Das Blut für alle übrigen Bestimmungen wird in Kunststoffröhrchen, die EDTA als Anticoagulans in feindispersierter Form enthalten, gesammelt.

Das Material zur Hochdruck-Flüssigkeits-, Dünnschicht- und Säulen-Chromatographie wird sofort gekühlt weiterverarbeitet.

Das Blut für die enzymatische Bestimmung mit Phosphoglycerat-Kinase und Luciferin-Luciferase wird bei -20° C eingefroren bis zur späteren Analyse des Hämolysates.

Im Routine-Labor werden am Entnahmetag die hämatologischen Parameter Leukozytenzahl, Erythrozytenzahl, Hb, Hkt, MCV und MCH sowie die blutchemischen Parameter Harnstoff, Kreatinin, Natrium, Kalium und anorganisches Phosphat bestimmt.

3. Vorbereitung der Proben
zur Dünnschicht- und Säulen-Chromatographie

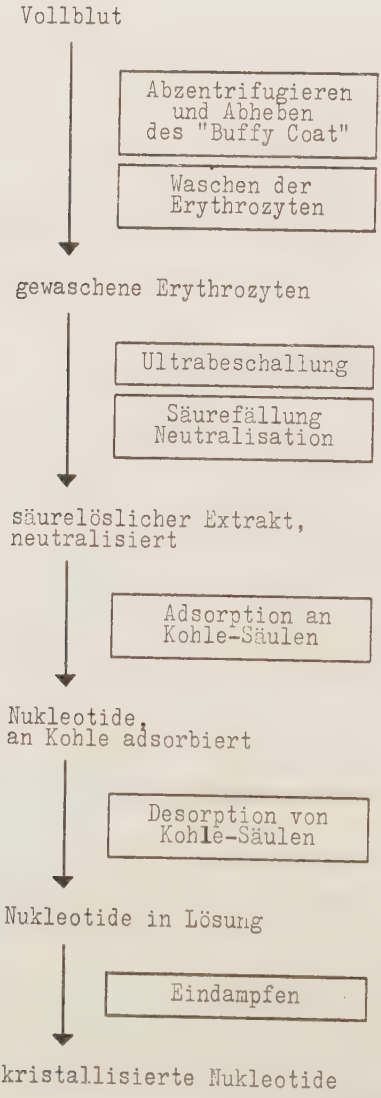


Abbildung 2

Das Blut, das bei der Entnahme aus der Kanüle in vorgekühlte Röhrchen tropft, wird eisgekühlt transportiert und sofort weiterverarbeitet (s. Abb. 2).

In der Kühlzentrifuge (Coolspin Cat. No. 34123-620; Fa. MSE FISONS) wird der "Buffy Coat" abzentrifugiert, anschliessend abgesaugt und verworfen (3000 Upm, 5 min).

Die Erythrozyten werden dreimal mit eisgekühlter 0,9 %iger NaCl-Lösung pH 7,4 gewaschen (je 3000 Upm; 5 min, 5 min, 10 min).

Das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV), der Hämatokrit (Hkt) und die Zellzahl der resuspendierten Erythrozyten (0,5 ml gewaschene Erythrozyten in 1,0 ml physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt) werden im Coulter-Counter (Model S-PLUS; Fa. Coulter Elektronics) bestimmt.

Es werden das MCV der Erythrozyten im Vollblut mit dem in NaCl-Lösung verglichen. So werden Aussagen möglich über die Qualität der Zell-Präparation und Membraneigenschaften der Erythrozyten im Vergleich Patienten zu Gesunden.

Je 1 ml gewaschener und gepackter Erythrozyten wird in Reagenzgläser überführt, mit je 4 ml 0,6 N PCA enteiweisst und anschliessend 60 sec ultrabeschallt in Kunststoff-Reagenzgläsern. Dabei werden die Reagenz-Gläser in Eiswasser gekühlt. (Braun- Sonic Homogenisator 300; Fa. Braun; Einstellung 60)
Als radioaktive Marker werden wahlweise zugegeben: 20 µl $C^{14}ATP$ bzw. $C^{14}dATP$ mit je $\sim 5 \times 10^{-8}$ Ci.

Die Proben werden zentrifugiert (3000 Upm, 5 min) und die säurelöslichen Überstände entnommen. Das Sediment wird noch zweimal mit je 2,0 ml 0,6 N PCA ausgewaschen (je 3000 Upm, 5 min). Die säurelöslichen

Überstände werden wiederum entnommen, vereinigt, zentrifugiert (3000 Upm, 10 min) und das Sediment verworfen.

Dieser säurelösliche Extrakt wird mit 2 M KOH im Eiswasserbad auf pH 5-6 neutralisiert; das ausgefallene $KClO_4$ wird abzentrifugiert.

Der neutralisierte Extrakt wird bei 4° C über Kohlesäulen gegeben, die folgendermassen hergestellt werden:

Einmal-Pipettenspitzen (1,0 x 9,0 cm) (No. 91789; Fa. Sarstedt) werden durch Plastikröhrchen (16 mm Ø) auf 18 cm verlängert, anschliessend wird ein 50 ml fassender Trichter (No. 904/6,5; Fa. Vitri) eingepasst. Als Filter dienen ca. 100 g Aktivkohle, die auf Glaswolle geschichtet ist.

Der säurelösliche und neutralisierte Extrakt wird dreimal über die Kohle gegeben. Die Kohle adsorbiert die Nukleotide. Verunreinigungen befinden sich im Fliessmittel.

Die adsorbierten Stoffe werden mit 50 ml Pyridin-Äthanol-Gemisch (10 %iges Pyridin in 50 ml absolutem Äthanol) (TSUBOI und PRICE 1959) von der Kohle desorbiert.

Dieser Schritt wurde erforderlich, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass bei Dünnschicht-Chromatographie der Extrakte ohne vorhergehende Kohle-Adsorption keine klare Trennung zu erzielen war, sondern Schlierenbildung zustande kam.

Die Pyridin-Äthanol-Lösung wird im Wasserbad bei 37° C im Sample-Concentrator eingedampft (Modell SC/12 + 8R; Fa. Brinkmann).

Die lyophilisierten Proben werden je nach geplanter Weiterverarbeitung verschieden aufgelöst:

Der Extrakt aus 1 ml gewaschenen Erythrozyten wird in 1 ml 50 %igem Äthanol gelöst (Dünnschicht-Chromatographie). Zur Säulen-Chromatographie wird der Extrakt aus 2 ml gewaschenen Erythrozyten in 0,5-0,6 ml Puffer I gelöst. Die Lösungen werden in Eppendorffhütchen überführt.

Die Radioaktivität der gewaschenen Erythrozyten und die Radioaktivität der Probe nach Präparation wird im Szintillationsspektrometer (Tri Carb, Liquid Szintillation Spectrometer, Model 544; Fa. Packard) bestimmt. Aus der Differenz wird der Verlust während der Präparation berechnet.

Der durchschnittliche Verlust an ATP bzw. dATP während der Präparation liegt bei 40 %.

Eine Unterbrechnung der Präparation ist zu folgenden Zeitpunkten möglich:

a) nach der Neutralisation des enteiweissten Extraktes,

b) nach der Kohle-Reinigung,

c) nach Auflösen in 50 %igem Äthanol oder in Puffer I.

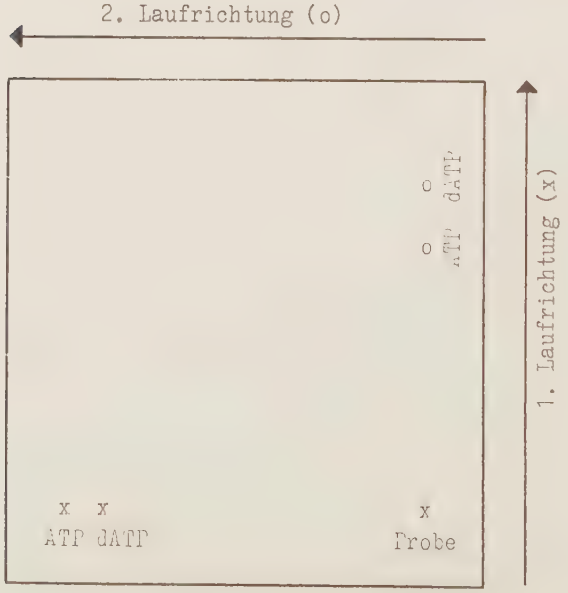
Die Proben müssen bei -20° C (a und c) bzw.bei 4° C (b) aufbewahrt werden.

4. Nachweis und semi-quantitative Bestimmung von ATP und dATP mit der Dünnschicht-Chromatographie

Zur Dünnschicht-Chromatographie werden fluoreszierende Polyäthylenimin (PEI)-Cellulose-Fertigplatten (20 x 20 cm, Schichtdicke 0,1 mm; Art. 5725; Fa. Merck) benutzt mit Fluoreszenz-Maximum bei λ = 254 nm. PEI-Cellulose-Platten sind Anionen-Austauscher und sehr gut geeignet zur qualitativen und semi-quantitativen Bestimmung von Nukleotiden, Nukleosiden und Nukleinsäure-Basen (RANDERATH 1961, RANDERATH und STRUCK 1961, RANDERATH 1962).

Abbildung 3

Zweidimensionale chromatographische Trennung



Zur zweidimensionalen chromatographischen Trennung (s. Abb. 3) wird die Probe am Startpunkt mit Mikropipette aufgetragen, je 2,5 cm vom rechten und unteren Rand entfernt. Das Probenvolumen (20-50 µl) wird so gewählt, dass die Platte nicht überladen ist. Kontrolle unter UV-Lampe (Fa. Waldmann) bei 254 nm.

Die radioaktiv markierten Reinsubstanzen werden 1,5 cm (ATP) bzw. 2,5 cm (dATP) vom linken und 2,5 cm vom unteren Rand aufgetragen. Die spezifische Aktivität ist nicht konstant, sondern richtet sich nach der jeweiligen Radioaktivität der applizierten Probe und liegt im Bereich von $\leqq 10^{-9}$ Ci.

Von den Reinsubstanzen werden ja 1 µl mit 10^{-8} mol ATP und dATP aufgetragen.

Zusätzlich werden in einem zweiten Durchgang Probenvolumen von 200-250 µl aufgetragen mit entsprechend radioaktiv markierten Reinsubstanzen ($\leqq 10^{-8}$ Ci), um die Möglichkeit zu haben, nur in Spuren vorhandene Substanzen zu entdecken.

Vor dem zweiten Lauf werden auf die um 90° gedrehten Platten die radioaktiv markierten Reinsubstanzen auf Gebiete aufgetragen, die - nach Betrachtung im UV-Licht - keine Substanzen enthalten; 2,5 cm vom unteren Rand entfernt.

Die Nachweisgrenze für ATP und dATP liegt im UV-Licht bei $\sim 10^{-9}$ mol.

Die aufsteigende Chromatographie erfolgt in verschlossenen Chromatographie-Tanks, die 1,2-1,5 cm hoch mit Laufmittel gefüllt sind. Maximal waren 4 Platten gleichzeitig in einem Tank.

Die Nukleotide werden in der ersten Laufrichtung mit 2 M NaCl : 2 N Essigsäure (1:1, v/v) als Fliessmittel aufgetrennt. Die Lösungsmittelfront ist ca. 14 cm oberhalb der Startlinie.

Die Platten werden in kalter Fönluft getrocknet und anschliessend zum Entsalzen für 20 min in eine Glasschale (23 x 23 x 7 cm) mit aufgelegter Glasplatte mit 700 ml Methanol gelegt.

Nach dem Trocknen in kalter Fönluft werden in der zweiten Laufrichtung (Platten um 90° nach rechts gedreht) die oxy-Nukleotide von den desoxy-Nukleotiden getrennt. Das Fliessmittel ist 10 %ige Borsäure : 6 M Ammoniumacetat (1:1), mit NH_4OH auf pH 7,0 eingestellt. Die Lösungsmittelfront befindet sich 17 cm oberhalb der Startlinie der zweiten Dimension.

Diese Versuchsanordnung wurde gewählt, nachdem in Vorversuchen der eigentlichen Trennung ein Lauf mit destilliertem Wasser (RANDERATH 1963, RANDERATH und RANDERATH 1964) vorangeschickt worden war, um Nukleoside, Nukleobasen und evtl. andere störende Stoffe vom Start zu entfernen.

Dies hat sich jedoch als unnötig herausgestellt: Der Extrakt aus gewaschenen Erythrozyten enthält fast nur Nukleotide. Nukleoside und Nukleobasen haben ihre Hauptlokalisation im Blutplasma, das jedoch nicht zur Chromatographie verwendet wird.

Die vorangehende Reinigung des Extraktes mit Kohle entfernt sonstige störende Substanzen in ausreichendem Masse.

Die o.g. Chromatographie-Methode orientiert sich an NEUHARD und MUNCH-PETERSEN (1966).

Anstelle von Lithiumchlorid (LiCl) wird jedoch NaCl als Komponente des ersten Laufmittels verwendet, da LiCl zu unregelmässiger Laufmittelfront führt. Ausserdem dauert es 40 min, die mit LiCl entwickelten Platten im Methanol-Bad zu entsalzen, im Vergleich zu 20 min bei NaCl.

Die höhere Konzentration des Laufmittels im Vergleich zur Methode von NEUHARD und MUNCH-PETERSEN ermöglicht

eine klarere Trennung zwischen oxy- und desoxy-Nukleotiden.

Eine höhere Konzentration des ersten Laufmittels, z.B. 4 M NaCl : 4 N Essigsäure (1:1, v/v), zeigt relativ höhere Rf-Werte für Adenin-Trinukleotide und Guanin-Abkömmlinge. Dieses Laufmittel ist also zu empfehlen für die Untersuchung von Stoffen, die langsamer wandern als ATP und bei niedrigerer Konzentration des Laufmittels dicht geballt nahe des Startpunktes zu finden sind.

Die gut getrockneten Platten werden im UV-Licht bei 254 nm betrachtet. Auf der Platte finden sich dunkle Flecken durch Fluoreszenzlöschung an den Stellen, an denen bei 254 nm fluoreszierende Substanzen, z.B. Nukleotide, liegen.

Die Flecken werden mit weichem Bleistift dünn markiert. Durchsichtige, feste Folie wird über die Platte gelegt und die Kennzeichnung auf die Folie übertragen. Durch Übereinanderlegen der verschiedenen Folien wird ein einfacher, schneller und exakter Vergleich verschiedener Chromatogramme möglich.

Die Identifizierung der Nukleotide erfolgt im UV-Licht über mitgelaufene Reinsubstanzen.

Die gewaschenen Erythrozyten sind selektiv mit ATP und dATP markiert. Aus der Differenz der Radioaktivität zwischen gewaschenen Erythrozyten und aufgelöstem Extrakt wird der Verlust durch die Präparation bestimmt mit Hilfe des Szintillationszählers (Tri Carb, Liquid Szintillation Spectrometer, Model 544; Fa. Packard).

Unter Berücksichtigung von Verlust und aufgetragenem Probenvolumen ist die semi-quantitative Bestimmung von ATP und dATP möglich.

Zusätzlich sind Nachweis und Identifizierung von Substanzmengen unter der UV-Nachweisgrenze möglich durch Autoradiographie. Die Belichtungszeit beträgt 4 Tage. Es werden Ducronex- und MAN-Filme verwendet. Die automatische Filmentwicklung wird in der Röntgenabteilung der Klinik durchgeführt.

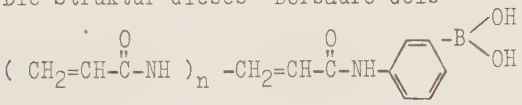
Alternativ zur Autoradiographie und Bestimmung der Radioaktivität der Proben im Szintillationszähler kann die Lokalisation und Messung der Radioaktivität auf der Dünnschicht-Platte mit einem Dünnschicht-Scanner (Dünnschicht-Scanner II, LB 2723; Fa. Berthold) erfolgen.

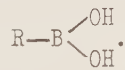
Der Autoradiographie-Film hat den Vorteil, die gleiche Grösse wie die Dünnschicht-Platte zu haben. Er kann deshalb einfach und schnell mit dem Dünnschicht-Protokoll auf der Folie verglichen werden.

5. Auftrennung in oxy- und desoxy-Nukleotide mit der Säulen-Chromatographie

Zur Trennung der oxy-Nukleotide von den desoxy-Nukleotiden wird ein Polyacrylamid-Affinitäts-Gel benutzt, an das m-aminophenyl-Borsäure angelagert ist. (Affi-Gel 601, Bio-Rad Laboratories, Catalog Number 153-6101)

Die Struktur dieses "Borsäure-Gels"



ist im folgenden abgekürzt als  .

Die an Polymer immobilisierten Dihydroxyboryl-Gruppen binden im alkalischen Milieu selektiv nebeneinanderliegende cis-hydroxyl-Gruppen (cis-diole). (BOESEKAN 1949, CONNER und BULGRIN 1967, KHYM 1967, UZIEL et al. 1976)

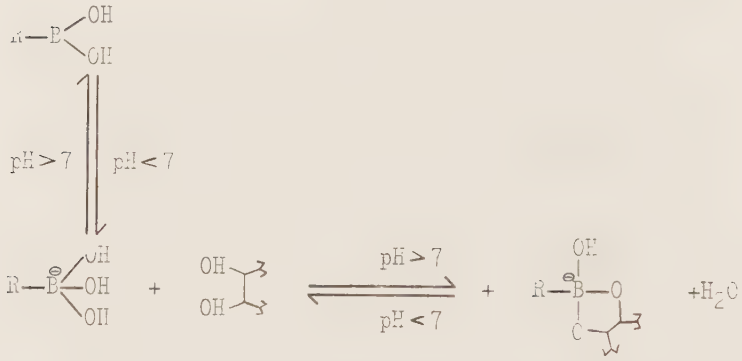
Die Bindung ist am stärksten, wenn ein im wesentlichen planarer 5-gliedriger Ring gebildet wird (CONNER und BULGRIN 1967).

Diese Komplexbildung mit cis-diolen ist im sauren Milieu reversibel.

Mono-ole können <u>nicht</u> gebunden werden.

Die Trennung zwischen desoxy- und oxy-Nukleotiden am Borsäure-Gel beruht also darauf, dass der Ribose-Anteil (mono-ol) der desoxy-Nukleotide das Gel durchfliesst, ohne gebunden zu werden, während der Ribose-Anteil (cis-Diol) der oxy-Nukleotide am Gel im alkalischen Milieu adsorbiert wird. Anschliessend werden die oxy-Nukleotide im sauren Milieu desorbiert (s. Abb. 4).

Abbildung 4: (nach UZIEL et al. 1976)



Das vom Hersteller pulverisiert gelieferte Gel wird 4 Std. in Puffer I (s.u.) hydriert, mit einer Vakuum-Pumpe entgast und in die Chromatographie-Säule (0,9 cm x 15 cm) gepackt (Fa. Pharmacia).

Versuchsanordnung s. Abb. 5

Das Fliessmittel-Reservoir versorgt die Säule mit Puffer. Das Eluat passiert ein Photometer (Uvicord S 2138; Fa. LKB), das Absorption und Transmission bei 280 nm kontinuierlich misst und automatisch auf einem Zwei-Kanal-Kompensationsschreiber (2-Channel-Recorder 2210; Fa. LKB) in Abhängigkeit von der Zeit aufzeichnet. Die den Peaks entsprechenden Eluate werden in getrennten Gefässen oder in einem automatischen Fraktionensammler aufgefangen.

Die zur Chromatographie verwendeten Fliessmittel sind:

Puffer I 0,1 M HEPES : 0,1 M Magnesiumacetat (1:1, v/v) mit KOH auf pH 8,45 (HAGEMANN 1977)

Puffer II 0,5 M Natriumacetat

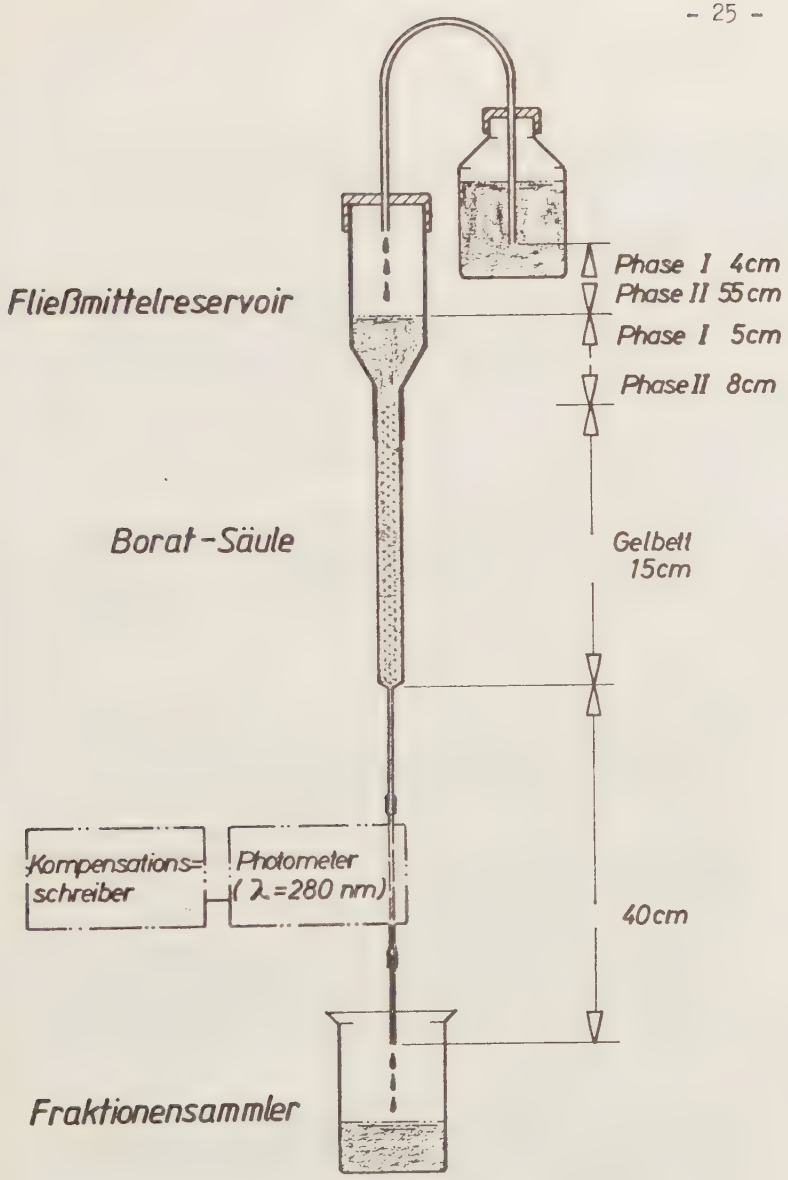


Abb. 5
Versuchsanordnung zur Auftrennung von oxy- und desoxy-Nukleotiden (Säulen-Chromatographie)

Phase I der Säulen-Chromatographie läuft bei 4° C ab (Combi Coldrac II 2201; Fa. LKB).

Die Säule wird solange mit Puffer I äquilibriert, bis die Absorption eine konstante Null-Linie zeigt.

Puffer I wird bis zur Oberfläche des Gels abgelassen. Der Extrakt (500 bis 600 µl) aus den wahlweise mit C^{14}-ATP oder C^{14}-dATP markierten Erythrozyten wird vorsichtig tropfenweise randfern auf das Gel aufgetragen und zum Einziehen gebracht. Die Säule wird für 30 min abgeklemmt ohne belastenden hydrostatischen Druck.

Ohne das Gel aufzuwühlen, wird Puffer I aufgebracht, bis eine Flüssigkeitssäule von 5 cm Höhe erreicht ist. Mit einer Fliessgeschwindigkeit von ca. 3 ml/min wird die Elution durchgeführt, bis der erste Peak (desoxy-Nukleotide) passiert und die Absorption wieder die Null-Linie erreicht hat.

Nachdem Puffer I bis zur Gel-Oberfläche abgelassen worden ist, wird der Ableitungsschlauch der Säule abgeklemmt. Puffer II wird aufgegeben bis zu einer Flüssigkeitssäule von 8 cm Höhe. Bei Zimmertemperatur wird die Säule einige Zeit stehen gelassen. Hydrostatischer Druck und Zeitdauer können so die Ablösung der oxy-Stoffe unterstützen.

Anschliessend werden mit einer Fliessgeschwindigkeit von ca. 8 ml/min bei Zimmertemperatur die oxy-Nukleotide mit Puffer II eluiert, bis die Absorption wieder die Null-Linie erreicht hat.

In Vorversuchen wurde zur Trennung von ATP und dATP 1 M Triäthylammoniumbikarbonat-Puffer pH 7,5 (RALPH und KHORANA 1961) ausprobiert, der von Schott et al. (1973) zur Trennung der oxy- von desoxy Monophosphaten benutzt wurde. Diese Methode konnte nicht übernommen werden: unser Gel sinterte zusammen und verklebte, so dass die Trennung von ATP und dATP nicht durchzuführen war.

Die den einzelnen Peaks entsprechenden Elutionen werden gefriergetrocknet (Modell Beta; Fa. Christ).

Die Kristalle werden aufgelöst in Aqua bidest. und der ATP- bzw. dATP-Gehalt der Eluate enzymatisch bestimmt mit der Phosphoglycerat-Kinase Methode (s.u.). Die Umrechnung auf ATP- bzw. dATP-Gehalt der Erythrozyten ist möglich, da Zellzahl und MCV der Probe bekannt sind.

Die Nachweisgrenze liegt bei 10^{-6} mol ATP bzw. dATP.

Die hier erprobte Trennung zwischen oxy- und desoxy-Nukleotiden wurde bisher noch nicht beschrieben. Puffer I wird von HAGEMANN (1977) zur cAMP-Bestimmung benutzt.

Die oxy- und desoxy-Fraktion könnte jeweils zerlegt werden in Mono-, Di- und Trinukleotide durch verminderte Fliessgeschwindigkeit, graduelle Änderung von pH und Ionenstärke sowie durch eine längere Säule.

Um die Haftung von ATP am Borsäure-Gel zu überprüfen, wird ATP auf das Gel aufgetragen und die o.g. Säulen-Chromatographie durchgeführt. In der I. Chromatographie-Phase zeigt die photometrische Registrierung keine Abweichung von der Null-Linie; der dem ATP entsprechende Peak zeigt sich erst bei Elution mit Puffer II (s. Abb. 6).

Die Trennung eines Gemisches von ATP und dATP ist aus Abb. 7 ersichtlich.

Nach Chromatographie eines mit C^{14}-markierten Gemisches ergibt die fraktionierte Messung der spezifischen Aktivität des Eluates II, dass sich immer noch Spuren von ATP ablösen, auch wenn photometrisch die Null-Linie schon erreicht ist.

Deshalb wird nach jedem Versuch das Gel aus der Säule in ein grosses Becherglas überführt. Mehrmals wird das fünffache Volumen an Puffer II zugegeben und gut gemischt auf dem magnetischen Rührer (Magnetic Stirrer Cat. No. 34521; Fa. CENCO INSTRUMENTEN B.V.). Nach Sedimentation des Gels wird Puffer II abgegossen. Anschliessend wird Puffer I zugegeben, das Gel entgast und die Säule neu gepackt.

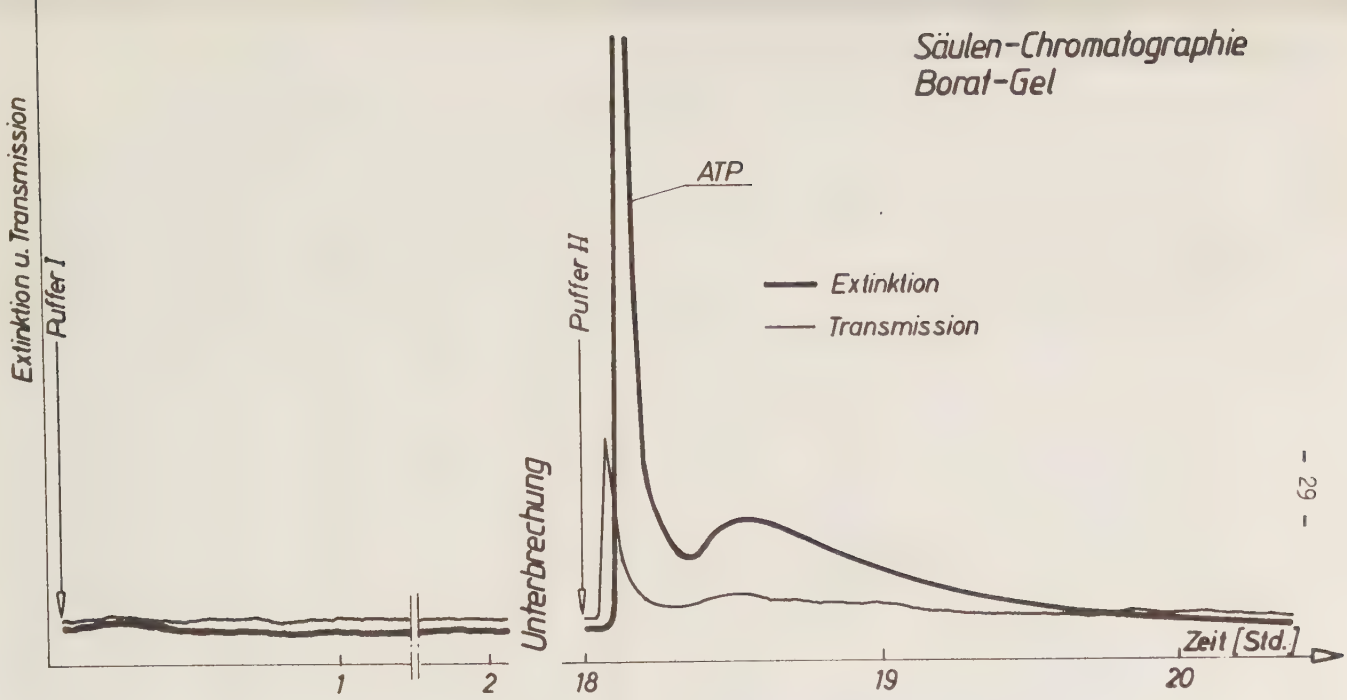


Abb. 6
Bindung von ATP im alkalischen Milieu (Puffer I)
Elution von ATP im sauren Milieu (Puffer II)
Auftrag von 0,002g ATP in 600µl Puffer I

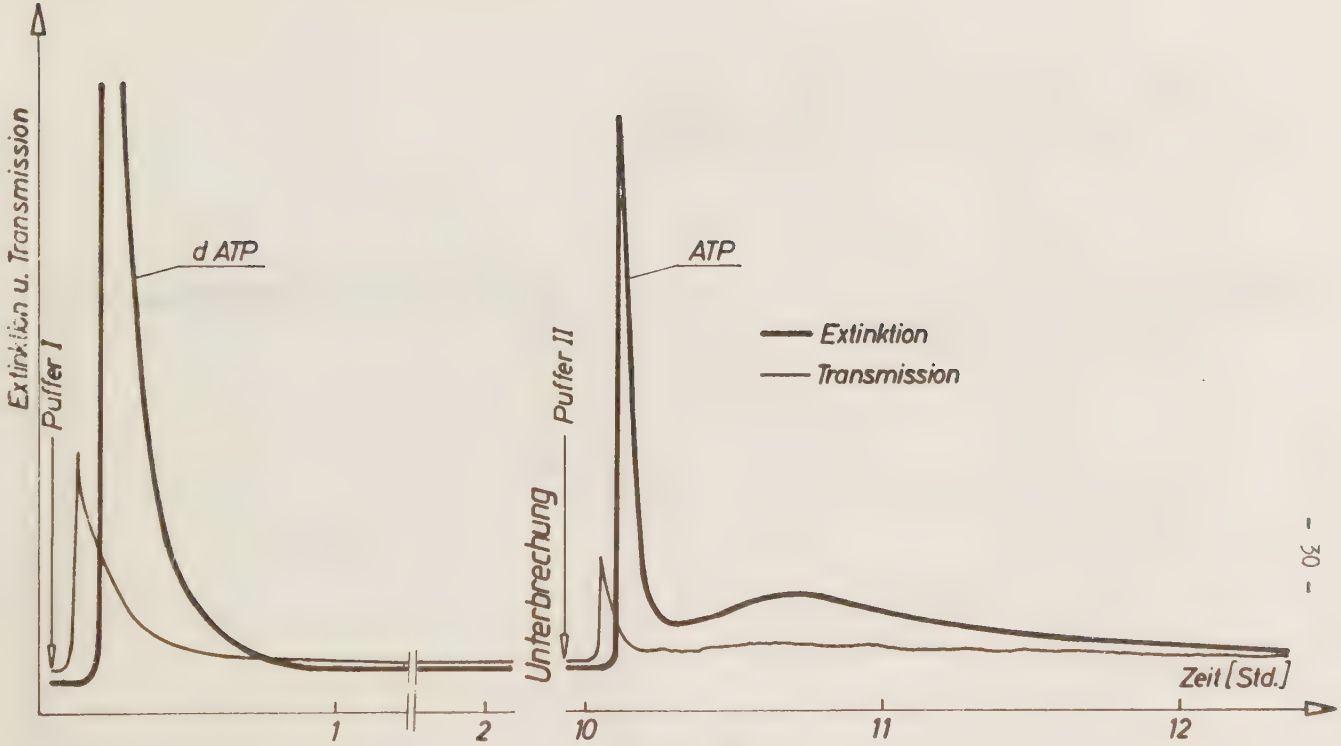


Abb. 7
Trennung von ATP und d ATP
Auftrag von je 0,0015g ATP u. d ATP in 600µl Puffer I
Säulen-Chromatographie Boral-Gel

6. Enzymatische Bestimmung von ATP und dATP mit der Phosphoglycerat-Kinase Methode

Die Phosphoglycerat-Kinase Methode wurde erstmals von BÜCHER (1947) beschrieben. Sie wird in vielen Modifikationen zur Bestimmung von (oxy)ATP angewendet, bisher jedoch nicht zur Bestimmung von desoxyATP eingesetzt.

Der Bestimmung liegt folgendes Reaktionsprinzip zugrunde:

3-Phosphoglycerat wird durch das Enzym Phosphoglycerat-Kinase umgesetzt unter Verbrauch von ATP bzw. dATP. In einer zweiten Reaktion wird das entstandene 1,3-Diphosphoglycerat mit $NADH_2$ weiterverarbeitet, wobei u.a. NAD^+ gebildet wird. Weitere Enzyme werden eingesetzt, damit ATP bzw. dATP vollständig abgebaut werden und sich die NAD^+-Ausbeute verdoppelt (JAWOREK et al. 1970).

Der Verbrauch an $NADH_2$ ist der ATP-Konzentration proportional und dient als Messgrösse. Bei Ablauf der Reaktionen im Photometer (Photometer 1101 M; Fa. Eppendorf) entspricht der $NADH_2$-Umsatz der Extinktionsdifferenz ΔE bei 360 nm. Ein Schreibgerät (Kompensationsschreiber 6512; Fa. Eppendorf), das an das Photometer angeschlossen ist, zeichnet die Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit auf.

Die zur Bestimmung erforderlichen Reagenzien sind in der Test-Kombination ATP (Fa. Boehringer, Mannheim) enthalten:

a) Gemisch von Triäthanolamin-Puffer (0,5 mol/l; pH 7,6), $MgSO_4$ (4 mmol/l) und Glycerat-3-phosphat (6 mmol/l) in wässriger Lösung

b) NADH (2,5 mmol/l) in wässriger Lösung

c) Gemisch von Phosphoglycerat-Kinase (= 450 U/ml), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (= 560 U/ml), Triosephosphat-Isomerase (= 1000 U/ml) und Glycerin-Phosphat-Dehydrogenase (= 80 U/ml)

Zur Messung werden in eine Glasküvette mit 1 cm Schichtdicke pipettiert und gemischt:

2,00 ml Reagenz a
0,20 ml Reagenz b und
0,20 ml Probe.

Nach einigen Minuten "Einschleich" wird durch Zugabe von

0,002 ml Reagenz c

die Reaktion gestartet. Die Messung wird beendet, sobald die Reaktion im "Ausschleich" ist. Versuchstemperatur 20-25° C.

Die Extinktionsdifferenz ΔE wird graphisch bestimmt (s. Abb. 8).

Die "Einschleich"-Strecke $\overline{AB}$ wird durch eine Gerade verlängert. Parallel dazu wird eine Gerade entlang der "Ausschleich"-Strecke angelegt. Senkrecht zur t-Achse wird eine Gerade durch den Startpunkt B gezogen. Der Schnittpunkt mit der "Ausschleich"-Geraden ist C. Die Strecke $\overline{BC}$ entspricht der Extinktionsdifferenz ΔE; der Leerwert L und die eventuelle Spreizung der E-Achse sind zu berücksichtigen.

Die "Einschleich"-Strecke ist sehr kurz im Vergleich zur Gesamtlänge des Versuches. Kleine Abweichungen in der Steilheit der Verlängerungsgeraden von $\overline{AB}$ verändern deshalb die Extinktionsdifferenz ΔE um bis zu 10 % über Verschiebungen der "Ausschleich"-Gerade.

Um Eichkurven für ATP und dATP erstellen zu können, werden ATP und dATP in aufsteigenden Konzentrationen gemessen. Die ATP- bzw. dATP-Konzentrationen in wässriger Lösung entsprechen Konzentrationen im Blut, das durch Enteiweissen um den Faktor 4,85 verdünnt ist. Durch Multiplikation mit dem Faktor 4,85 lassen sich folglich die entsprechenden Substratkonzentrationen im "künstlichen Blut" ermitteln. Diese Konzentrationen im "künstlichen Blut" werden gegen die graphisch er-

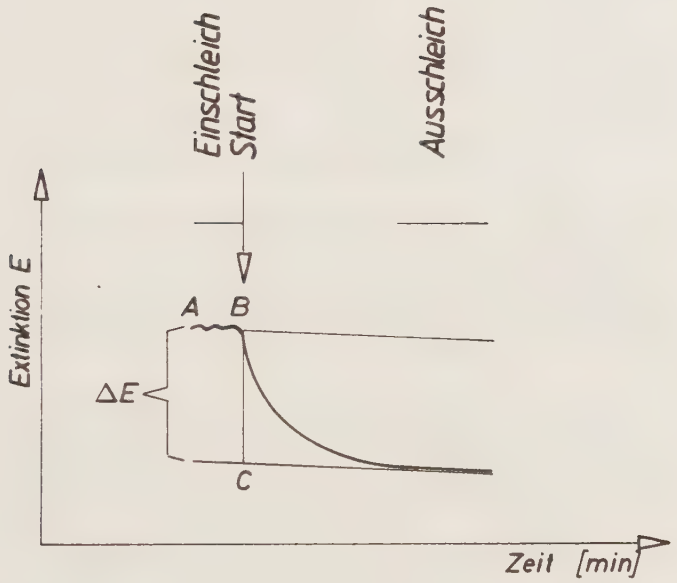


Abb. 8
Phosphoglycerat-Kinase Methode
Graphische Bestimmung der
Extinktionsdifferenz ΔE

mittelten Extinktionsdifferenzen aufgetragen und die Messpunkte durch eine Gerade verbunden. Die Steigung der jeweiligen Gerade ist der Faktor, mit dem ΔE multipliziert wird zur Bestimmung der jeweiligen Substratkonzentrationen im Blut.

Die Substratkonzentrationen lassen sich errechnen aus

$c = 950 \cdot \Delta E$ (10^{-6} mol ATP / 100 ml Blut) bzw.

$c = 1650 \cdot \Delta E$ (10^{-6} mol dATP / 100 ml Blut).

Die Eichkurve für ATP und die zugehörigen Messergebnisse und Berechnungen sind aus Abb. 9 und Tabelle 7 ersichtlich, die entsprechenden Daten für dATP gehen aus Abb. 10 und Tabelle 8 hervor.

Die Extinktionsdifferenzen sind für ATP sehr viel grösser als für dATP in äquimolaren Konzentrationen. Das Enzym Phosphoglycerat-Kinase scheint also dATP in geringerem Masse umzusetzen als ATP.

Die zeitaufgelösten Darstellungen der Reaktionsabläufe (s. Abb. 11 und 12) zeigen, dass die Extinktionsdifferenzen/min bei Einsatz von ATP sehr viel höher sind als bei dem von dATP.

Phosphoglycerat-Kinase utilisiert offensichtlich dATP in geringerem Masse und langsamer als ATP. Die Affinität von Phosphoglycerat-Kinase zu dATP scheint folglich geringer zu sein als die zu ATP.

Vor dem Einsatz der Methode bei Probanden, deren Blut zusätzlich zu ATP erhöhte Spiegel an dATP haben könnte, ist zu prüfen, ob und inwiefern dATP die Messung von ATP beeinflusst.

Hierzu wird ein Gemisch aus $1{,}0 \cdot 10^{-4}$ M ATP (entspricht einer mittleren Blutkonzentration) und $0{,}4\text{-}1{,}6 \cdot 10^{-4}$ M dATP gemessen.

Es zeigt sich, dass dATP in Konzentrationen von $0{,}4\text{-}0{,}6 \cdot 10^{-4}$ M in Kombination mit $1{,}0 \cdot 10^{-4}$ M ATP

Gesamtextinktionen ergibt, die geringer sind als die zu errechnenden Summationsextinktionen von ATP und dATP in entsprechenden Konzentrationen.

Bei höheren Konzentrationen von dATP ($0{,}8\text{-}1{,}6 \cdot 10^{-4}$ M) in Kombination mit $1{,}0 \cdot 10^{-4}$ M ATP ergeben sich allerdings sehr viel höhere Extinktionen als bei getrennter Bestimmung der Bestandteile des Gemisches.

Es stellt sich die Frage, ob niedrige Konzentrationen von dATP einen hemmenden, höhere Konzentrationen von dATP einen fördernden Einfluss auf Phosphoglycerat-Kinase ausüben. Diese Problematik soll aber in diesem Kontext nicht weiter diskutiert werden.

Für den Einsatz der Phosphoglycerat-Kinase Methode bei Probanden ergibt sich folgende Konsequenz:
Sollte durch die Dünnschicht-Chromatographie dATP nachgewiesen werden, so ist zusätzlich zu Blut ATP bzw. dATP in den schon vorgetrennten oxy- und desoxy-Fraktionen (Säulen-Chromatographie) zu bestimmen. Das Vortrennen ist unvermeidlich, da die ATP/dATP-Relationen der einzelnen Proben unbekannt sind und deshalb der dATP-Einfluss auf ATP nicht vorhersehbar ist.

Es wird also unterschiedliches Probenmaterial bearbeitet:

1) Hämolysat von Patienten und gesunder Kontrollgruppe wird enteiweisst mit 0,6 N PCA (1+4). Nach zehnminütigem Stehenlassen bei 20-25° C wird für 10 min zentrifugiert (3000 Upm). Der zur Messung bestimmte Überstand wird abgehoben. Die ATP-Konzentration des Hämolysates liegt in der enteiweissten Lösung in einer 4,85-fachen Verdünnung vor (Wert nach TEST-FIBEL FA. BOEHRINGER 1978).
2) Die über Säulen-Chromatographie gewonnenen oxy- und desoxy-Nukleotid-Fraktionen, die gefriergetrocknet sind, werden in Aqua bidest. wieder gelöst. In dieser wässrigen Lösung wird die ATP- bzw. dATP-Konzentration gemessen.

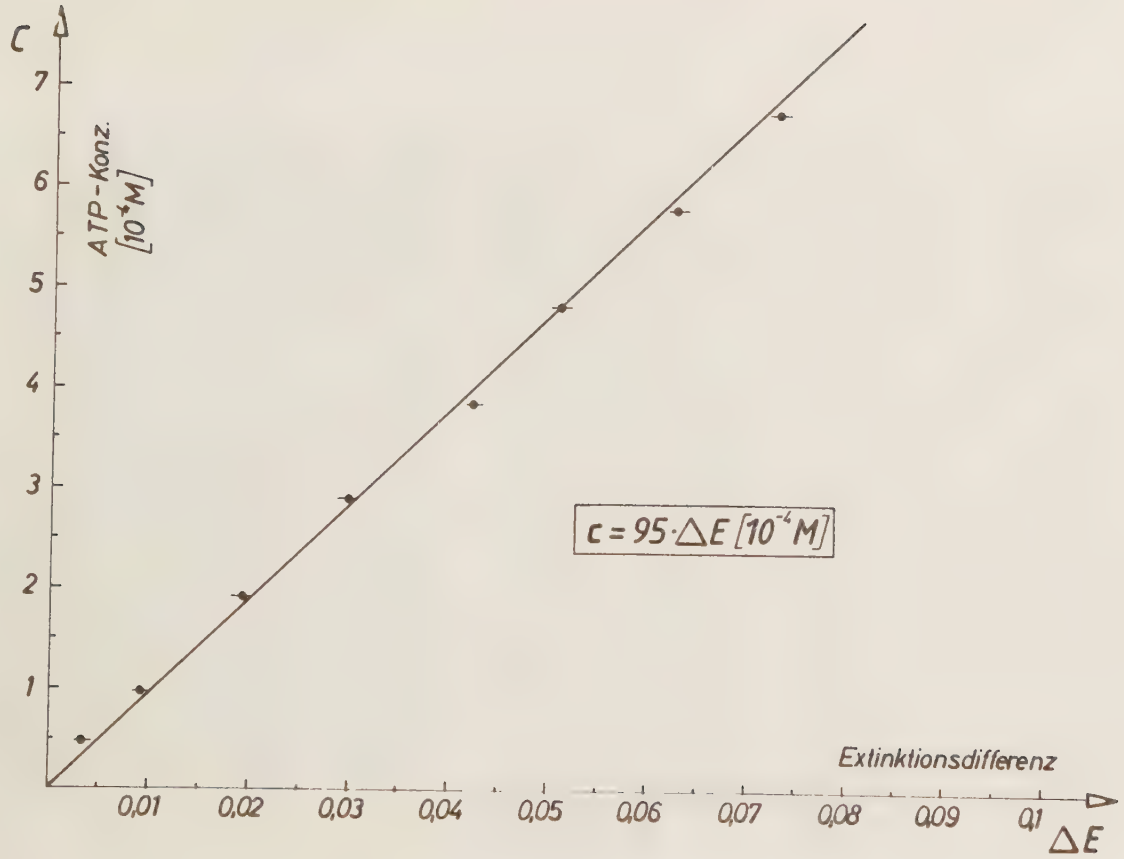

c
ATP-Konz.
[10⁻⁴M]
7
6
5
4
3
2
1
c = 95·ΔE [10⁻⁴M]
Extinktionsdifferenz
0,01
0,02
0,03
0,04
0,05
0,06
0,07
0,08
0,09
0,1
ΔE

Abb. 9

Tabelle 7: zur Eichkurve ATP

Konzentration in der hergestellten wässrigen Lösung	Konzentration im künstlichen Blut (Faktor 4,85)	Extinktion E_2 - Extinktion E_1	Leerwert L	$E_2-E_1-L = \Delta E'$	$\Delta E'/2 = E$	ΔE (Mittelwert)
$1,4 \cdot 10^{-4}$ M	$6,80 \cdot 10^{-4}$ M	0,811 - 0,658 0,832 - 0,682	0,006 0,006	0,147 0,144	0,0735 0,0720	0,0728
$1,2 \cdot 10^{-4}$ M	$5,82 \cdot 10^{-4}$ M	0,804 - 0,671 0,828 - 0,700	0,006 0,006	0,128 0,122	0,0640 0,0610	0,0625
$1,0 \cdot 10^{-4}$ M	$4,85 \cdot 10^{-4}$ M	0,812 - 0,702 0,827 - 0,721	0,006 0,006	0,104 0,100	0,0520 0,0500	0,0510
$0,8 \cdot 10^{-4}$ M	$3,88 \cdot 10^{-4}$ M	0,830 - 0,744 0,538 - 0,447	0,006 0,008	0,086 0,083	0,0430 0,0415	0,0423
$0,6 \cdot 10^{-4}$ M	$2,91 \cdot 10^{-4}$ M	0,822 - 0,755 0,544 - 0,478	0,006 0,008	0,061 0,058	0,0305 0,0290	0,0298
$0,4 \cdot 10^{-4}$ M	$1,94 \cdot 10^{-4}$ M	0,823 - 0,780 0,570 - 0,522	0,006 0,008	0,037 0,040	0,0185 0,0200	0,0193
$0,2 \cdot 10^{-4}$ M	$0,97 \cdot 10^{-4}$ M	0,553 - 0,528 0,570 - 0,542	0,008 0,008	0,017 0,020	0,0085 0,0100	0,0093
$0,1 \cdot 10^{-4}$ M	$0,49 \cdot 10^{-4}$ M	0,555 - 0,539 0,554 - 0,540	0,008 0,008	0,008 0,006	0,0040 0,0030	0,0035

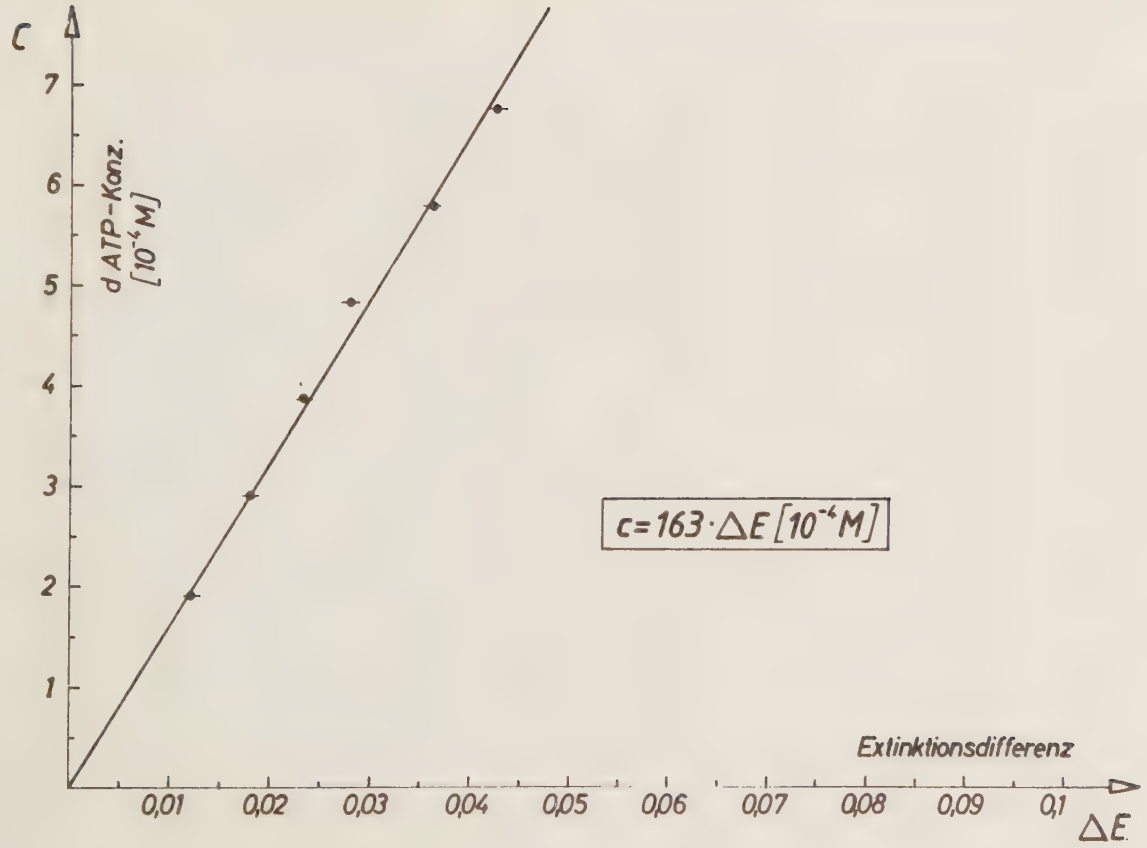


Abb. 10
Eichkurve dATP

Tabelle 8 : zur Eichkurve desoxy-ATP

Konzentration in der hergestellten wässrigen Lösung	Konzentration im künstlichen Blut (Faktor 4,85)	Extinktion E_2 -- Extinktion E_1	Leerwert L	$E_2-E_1-L = \Delta E'$	$\Delta E'/2 = \Delta E$	ΔE (Mittelwert)
$1,4 \cdot 10^{-4}$ M	$6,80 \cdot 10^{-4}$ M	0,850 - 0,749 0,833 - 0,753 0,866 - 0,772	0,006 0,006 0,006	0,095 0,074 0,088	0,0475 0,0370 0,0440	0,0428
$1,2 \cdot 10^{-4}$ M	$5,82 \cdot 10^{-4}$ M	0,821 - 0,743 0,855 - 0,776	0,006 0,006	0,072 0,073	0,0360 0,0365	0,0363
$1,0 \cdot 10^{-4}$ M	$4,85 \cdot 10^{-4}$ M	0,812 - 0,741 0,888 - 0,835	0,006 0,006	0,065 0,047	0,0325 0,0235	0,0280
$0,8 \cdot 10^{-4}$ M	$3,88 \cdot 10^{-4}$ M	0,865 - 0,818 0,820 - 0,763	0,006 0,006	0,041 0,052	0,0205 0,0260	0,0233
$0,6 \cdot 10^{-4}$ M	$2,91 \cdot 10^{-4}$ M	0,866 - 0,820 0,805 - 0,767	0,006 0,006	0,040 0,032	0,0200 0,0160	0,0180
$0,4 \cdot 10^{-4}$ M	$1,94 \cdot 10^{-4}$ M	0,849 - 0,816 0,820 - 0,791 0,832 - 0,802	0,006 0,006 0,006	0,027 0,023 0,024	0,0135 0,0115 0,0120	0,0123

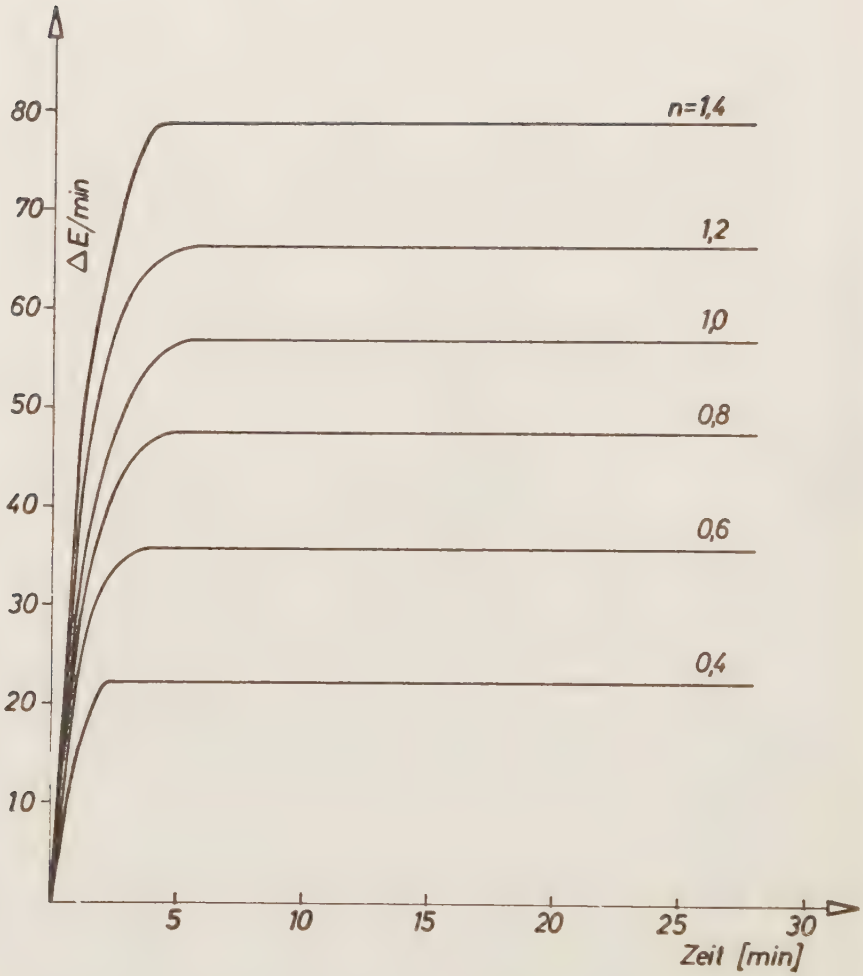


Abb. 11
Extinktionsdifferenz ΔE/min
für $n \cdot 10^{-4}$ M ATP

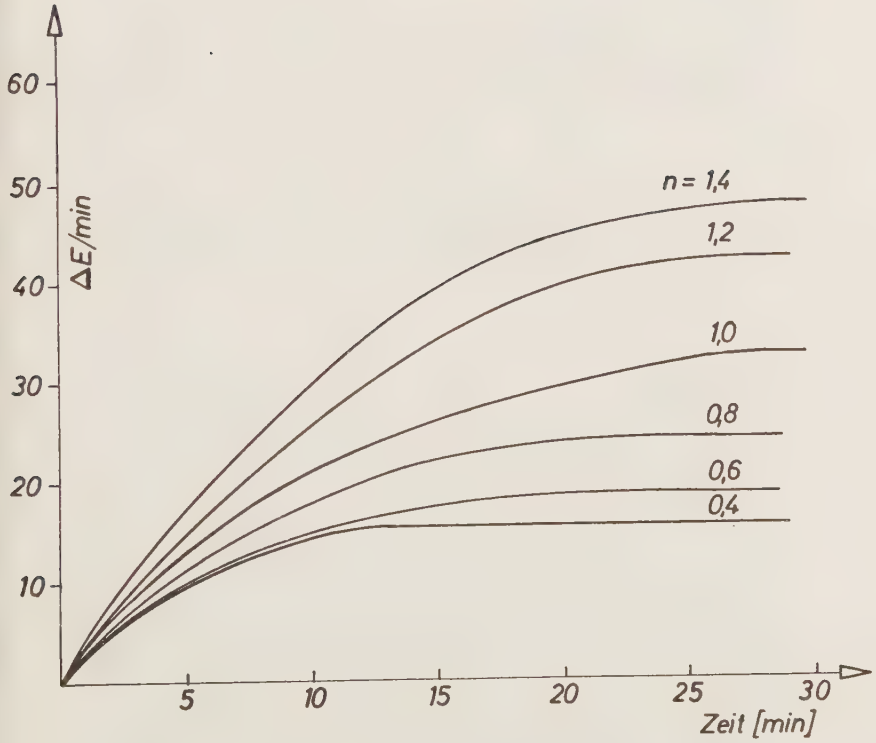


Abb. 12
Extinktionsdifferenz $\Delta E/min$
für $n \cdot 10^{-4}$ M d ATP

7. Enzymatische Bestimmung von ATP und dATP mit der Luciferin-Luciferase Methode

Diese Methode zeigt folgendes Testprinzip (Übersicht bei STREHLER 1970):

$$ATP + Luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase,\ Mg^{++}} Oxiluciferin + PP_i + AMP + CO_2 + Licht$$

Luciferin - ein Stoff aus den Leuchtorganen von Glühwürmchen (American firefly) - wird durch das Enzym Luciferase zum fluoreszierenden Oxiluciferin umgesetzt. Hierzu ist ATP notwendig, dessen Umsatz proportional zur Lichtemission ist.

Vor der Messung wird Blut mit 0,6 N PCA enteiweisst im Verhältnis 1:3. Der Überstand wird mit KOH neutralisiert. Nach Abzentrifugieren des Sedimentes wird die enteiweisste Lösung mit Phosphatpuffer 1:1000 verdünnt.

Zur Messung werden in eine Küvette jeweils pipettiert und gemischt

100 µl der enteiweissten und verdünnten Probe
100 µl Luciferin-Luciferase in 0,025 HEPES-Puffer pH 7,75.

Die Messung erfolgt über einen Quantenzähler (Lumacounter TM M2080; Fa. LUMAC) gegen interne Standards. Nach Reaktionsstillstand kann aus der Digitalanzeige des Messgerätes unter Kenntnis des Verdünnungsfaktors direkt die ATP-Konzentration berechnet werden.

Die untere Nachweisgrenze der Methode liegt bei $\sim 10^{-9}$ mol ATP. dATP kann mit dieser Methode nicht gemessen werden, da Luciferase nur mit ATP in Reaktion tritt.

8. Gewinnung und Vorbereitung des Probenmaterials zur Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Mit der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie sollen Vorkommen und Verteilung der Nukleoside und Nukleinsäure-Basen im Blut untersucht werden. Zusätzlich sollen Adenosin und desoxy-Adenosin quantitativ bestimmt werden.

Bei Gewinnung und Vorbereitung des Materials ist zu berücksichtigen, dass Adenosin schnell verstoffwechselt wird. Der Übertritt von Adenosin aus dem Blut in die Zellen wird durch Dipyridamol gehemmt. Der Adenosinabbau zu Inosin lässt sich durch zügiges Arbeiten bei 4^{o} C vernachlässigbar gering halten.

Das angewandte Verfahren orientiert sich an SCHRADER, der auch die Apparatur zur Gewinnung der Proben freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat (Abb. 13-15).

Der statische Teil dieser Apparatur besteht aus einem Plexiglas-Block (17,5 x 2,0 x 3,0 cm), der mit Vertiefungen ausgestattet ist, in die ein Vierwegestück sowie Spritze 1 (2 ml) und Spritze 2 (4 ml) eingebettet sind. Eine Halterung an der vorderen Blockkante nimmt Spritze 3 (2 ml) auf. (Spritzen der Fa. B-D Plastipak) Das Vierwegestück wird über kurze Schläuche (3 mm Innendurchmesser) mit den drei Spritzen verbunden. Am vierten Zugang kann ein Schlauch, der Blut zuführt, angeschlossen werden.

Der dynamische Teil der Apparatur wird von einem Bügel gebildet, dessen Führungsstab längs durch den Plexiglas-Block verläuft. Die Kolbenzüge von Spritze 1 und Spritze 2 werden so eingerastet, dass Bewegungen des Bügels entgegengesetzte Volumenänderungen der Spritzen bewirken.

Abb. 13

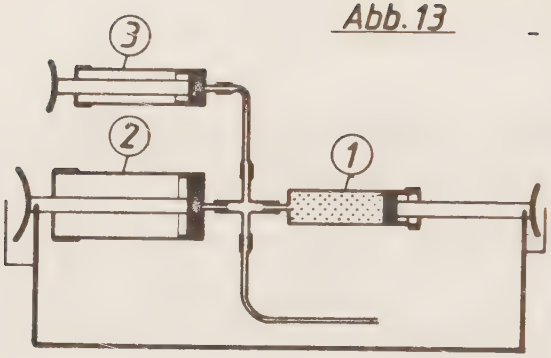


Abb. 14

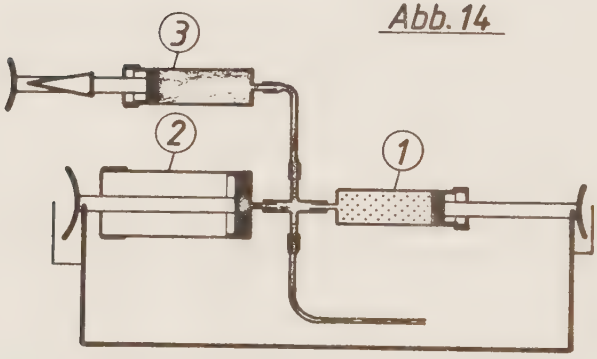
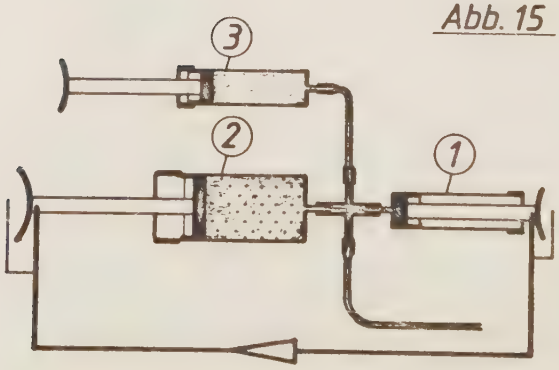


Abb. 15



Apparatur zur Probengewinnung
für die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Jeweils vor der Probengewinnung wird eisgekühlte Dipyridamol-Locke Lösung hergestellt aus 0,2 ml Dipyridamol-Stammlösung (50 mg = 10 ml = 10 mM) und 9,8 ml Locke-Lösung.

Die Locke-Lösung wird folgendermassen angesetzt:

900 mg NaCl
42 mg KCl
50 mg $NaHCO_3$
100 mg Glukose
240 µl $CaCl_2$ (10 %ig)
800 µl 0,125 molarer Phosphatpuffer, pH 7,4

ad 98 ml mit H_2O bidest.

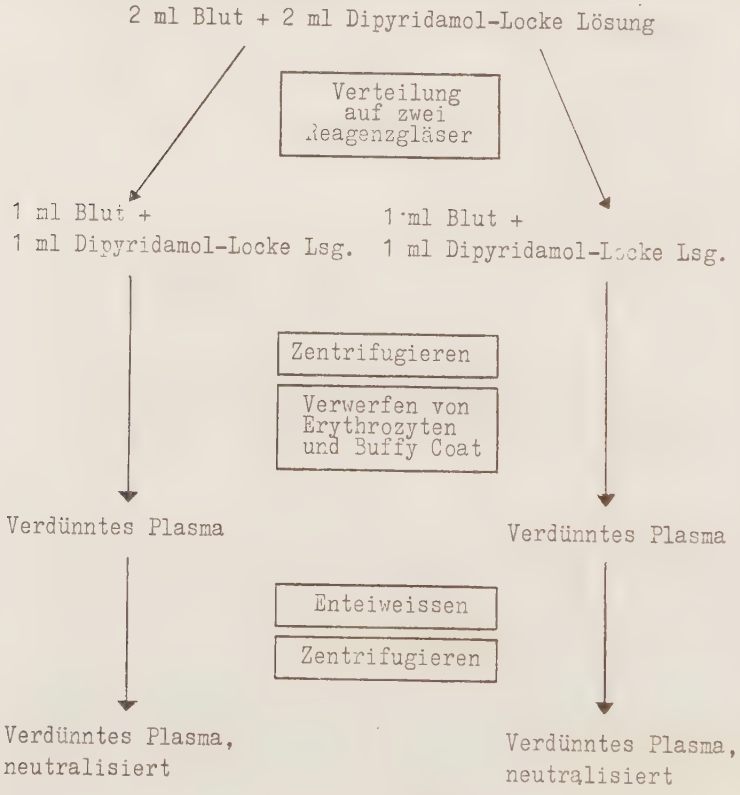
Mit der gepufferten Dipyridamol-Lösung ($2 \cdot 10^{-4}$ M/l) wird Spritze 1 und der Raum zwischen Spritze 1 und Spritze 2 gefüllt. Das System wird auf Eis gekühlt (Abb. 13).

Zur Probengewinnung wird der blutzuführende Schlauch mit dem System verbunden. Spritze 3 wird zurückgezogen, damit sich das Verteiler-System mit Blut füllt (Abb. 14). Der Bügel ist so eingestellt, dass die Spritze 1 2 ml Dipyridamol-Locke Lösung enthält und der Stempel von Spritze 2 vollständig hereingedrückt ist. Der Bügel wird nun in Richtung auf Spritze 2 verschoben bis zum Anschlag des Stempels von Spritze 1. Über das Mehrwegestück wird so gleichzeitig das Volumen aus Spritze 1 und Blut in Spritze 2 gesaugt im Verhältnis 1:1 und durchmischt, bis Spritze 2 mit 4 ml gefüllt ist (Abb. 15).

Die Aufarbeitung des so gewonnen Gemisches in Spritze 2 ist in Abb. 16 schematisch dargestellt.

Abbildung 16

Aufarbeitung zur Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie



Der Inhalt von Spritze 2 (2 ml Blut und 2 ml Dipyridamol-Locke Lösung) wird gleichmässig auf zwei vorgekühlte Reagenzgläser verteilt. Pro Proband werden also zwei identische Proben verarbeitet.

Durch Zentrifugieren (3000 Upm, 5 min, 4° C) (Coolspinn Cat. No. 34123-602; Fa. MSE FISONS) werden Erythrozyten und Buffy Coat vom Überstand abgetrennt. Er wird in Reagenzgläser, die in Eiswasser

stehen, überführt. Das Sediment wird verworfen. Der Überstand besteht aus Plasma, das durch Dipyridamol-Locke Lösung unterschiedlich verdünnt ist, abhängig vom Hämatokrit des Probandenblutes. Das Volumen des Überstandes errechnet sich nach a =

$$\frac{100 - Hk}{100}$$ ml Plasma + 1 ml Dipyridamol-Locke Lösung.

Mit je 1 ml 0,6 N Perchlorsäure wird der Überstand enteiweisst. Nach Zentrifugation (3000 Upm, 5 min, 4° C) wird der enteiweisste Überstand abgenommen und bis zur Chromatographie bei -20° C gelagert.

9. Quantitative Bestimmung von Adenosin und desoxy-Adenosin sowie Analyse der Nukleoside und Nukleinsäure-Basen mit der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Jeweils eine Probe pro Proband lagert z.Zt. noch bei -20° C. In naher Zukunft wird nach Vorreinigung die Auftrennung durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie erfolgen, wobei die Eluate fraktioniert gesammelt werden. Die den einzelnen Peaks entsprechenden Fraktionen werden evtl. zur weiteren Auftrennung nochmals chromatographiert.

Die Identität der verschiedenen Peaks wird durch Untersuchungen am Massenspektrometer abgeklärt werden.

Die übrigen Proben wurden tiefgekühlt auf schnellstem Wege zur Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie und Ermittlung des Adenosingehaltes weiterbefördert.

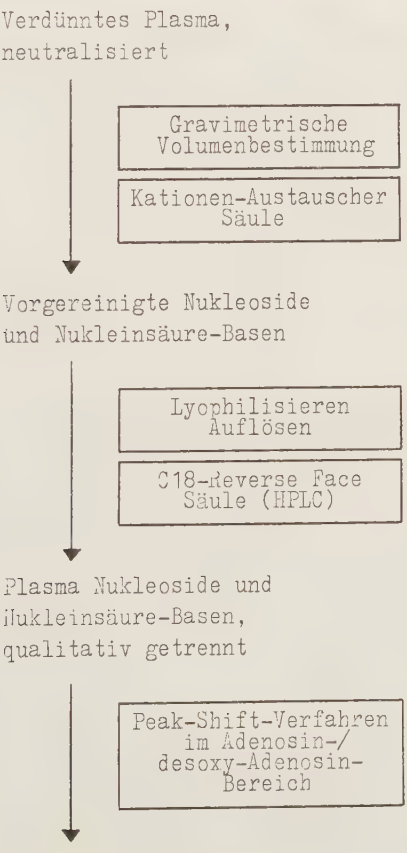
Die Aufarbeitung der Proben ist in Abbildung 17 dargestellt.

Die Probenvolumina werden gravimetrisch ermittelt. Über kleine Kationen-Austauschsäulen (AG-1-X2) werden die Proben vorgereinigt. Das Säuleneluat wird lyophilisiert, anschliessend in 100 µl aufgelöst und aufgetragen auf eine C18-Reverse Face-Säule. Die Trennung erfolgt mit einem Gradienten-Programm von 45 min Dauer. Der angeschlossene Schreiber zeichnet die photometrisch bei 254 nm gemessene Extinktion bei zwei verschiedenen Detektorempfindlichkeiten in Abhängigkeit von der Zeit auf.

Adenosin chromatographiert gemeinsam mit einer nicht genauer identifizierten Substanz. Deshalb wird im Bereich von Adenosin und desoxy-Adenosin das Eluat auf-

gefangen, mit Adenosin-Desaminase behandelt, lyophilisiert und erneut über die C18-Säule gegeben. Die Umwandlung von dem in der Probe vorhandenen Adenosin bzw. desoxy-Adenosin zu Inosin bzw. desoxy-Inosin ist hierbei vollständig, so dass über die Peak-Flächen von Inosin bzw. desoxy-Inosin die jeweiligen Nukleosidmengen bestimmt werden können (Peak-Shift-Verfahren).

Abbildung 17 Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie



Aus den übermittelten Werten kann die Adenosin-Konzentration im Plasma berechnet werden. Nach SCHRADER gilt:

$$\text{Adenosin (pmol/ml Plasma)} = 2{,}5 \cdot \frac{a \cdot c}{b \cdot d}$$

a = verdünntes Plasma-Volumen (ml)
= (100-Hk):100 ml Plasma + 1 ml Dipyridamol-Locke Lsg.
b = Plasma-Volumen (ml)
= (100-Hk):100 ml Plasma
c = Adenosin-Menge in der chromatographierten Probe (pmol)
d = Volumen der Probe (ml)

Die Adenosin-Konzentration im Blut ist bei Kenntnis des Hämatokrit Hk zu errechnen. Bei bekannter Erythrozytenzahl/ml Blut lässt sich die Adenosin-Menge, die einem Erythrozyten zur Verfügung steht, ermitteln.

Die Peaks der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatogramme entsprechen den Inhaltsstoffen der Proben. Die Identität einzelner Peaks lässt sich über bekannte Substanz-Laufzeiten abklären. Die Peak-Höhe und die Fläche unter den Peaks stehen im Verhältnis zur Inhaltsstoff-Menge. Jede Probe erhält so ihr spezifisches Peak-Muster.

Um die Peak-Muster der einzelnen Chromatogramme vergleichen zu können, werden die Chromatogramme auf durchsichtige Folien kopiert. Die Folien werden so übereinander gelegt, dass sich die Chromatographie-Startpunkte und -Grundlinien zur Deckung bringen. Um den Überblick zu wahren, werden nur die höheren Peaks zum Vergleich herangezogen. Anschliessend wird das Summations-Peak-Muster von Patienten sowie Gesunden jeweils auf eine neue Folie aufgetragen, die über den zu vergleichenden Chromatogrammen liegt.

Die auf der Folie erstellten Summationskurven der Chromatogramme von Patienten und Gesunden können wiederum durch Übereinanderlegen verglichen werden. Die Auswertung erfolgt per Hand; auf die Erstellung eines Computer-Programmes zur Ermittlung und Bewertung der Summationskurven wird verzichtet.

10. Verwendete Chemikalien

Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Na_2-Salz, krist. reinst
Art. 10920
Fa. Serva

[C^{14}]-Adenosin-5'-triphosphat (C^{14}ATP), Ammonium-Salz
Art. CFB. 91
Fa. Amersham Buchler

Adenosintriphosphat, UV Methode, Test-Kombination
Art. 123897
Fa. Boehringer

Äthanol (Äthylalkohol) absolut p.A.
Art. 972
Fa. Merck

Aktivkohle p.A.
Art. 2188
Fa. Merck

Ammoniaklösung p.A., min. 25 %ig (NH_4OH)
Art. 5432
Fa. Merck

Ammoniumacetat krist. reinst
Art. 1115
Fa. Merck

Borsäure krist. p.A.
Art. 165
Fa. Merck

Calciumchlorid entwässert gepulvert rein ($CaCl_2$)
Art. 2388
Fa. Merck

desoxyAdenosin-5'-triphosphat (dATP), Na_2-Salz,
krist. reinst
Art. 18300
Fa. Serva

desoxy-[C^{14}]-Adenosin-5'-triphosphat (C^{14}dATP),
Ammonium-Salz
Art. CFB. 158
Fa. Amersham Buchler

Dipyridamol = Persantin, Spritzampulle
2 ml = 10 mg Dipyridamol
Fa. Thomae

Essigsäure min. 96 % p.A. (Eisessig)
Art. 62
Fa. Merck

D(+)-Glucose (Monohydrat)
Art. 8342
Fa. Merck

N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-äthansulfonsäure p.A.
(HEPES)
Art. 25245
Fa. Serva

Kaliumchlorid p.A. (KCl)
Art. 4936
Fa. Merck

Kaliumhydroxid Plätzchen p.A. (KOH)
Art. 5033
Fa. Merck

Lumit PM (hochgereinigte Luciferin-Luciferase und
0,025 M HEPES pH 7,75)
Art. 4623
Fa. Lumac Systems

Magnesiumacetat p.A.
Art. 5819
Fa. Merck

Methanol p.A.
Art. 6009
Fa. Merck

Natriumacetat krist. reinst
Art. 6265
Fa. Merck

Natriumchlorid krist. p.A. (NaCl)
Art. 6404
Fa. Merck

Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat p.A.
($NaH_2 PO_4$)
Art. 6346
Fa. Merck

Natriumhydrogencarbonat p.A. ($NaHCO_3$)
Art. 6329
Fa. Merck

di-Natriumhydrogenphosphat p.A. (Na_2HPO_4)
Art. 6586
Fa. Merck

Perchlorsäure (PCA) 0,6 N
Art. 125 377
Fa. Boehringer

Pyridin p.A.
Art. 9728
Fa. Merck

Triäthanolamin-Hydrochlorid, krist.
Art. 1108154
Fa. Boehringer

Statistische Auswertung

Der arithmetische Mittelwert $\bar{x}$ wird aus den n Einzelwerten x_i der jeweiligen Stichprobe (z.B. ATP-Werte der Patienten) folgendermassen berechnet:

$$\bar{x} = (x_1 + x_2 + ... + x_n) / n$$

Auf die Berechnung der Standardabweichungen wird verzichtet, da die Normalverteilung der Einzelwerte einer Stichprobe anhand der vorliegenden Fallzahlen nicht bewiesen werden kann. Zur orientierenden Übersicht werden jeweils die Extremwerte der Stichprobe angegeben.

Die Statistik wird unter Verwendung des "Statistic Program for Social Sciences" (SPSS), Version 7, und des "Biomedical Comparison Program" (BDP) auf der Grossrechenanlage des Rechenzentrums der Universität Düsseldorf (Professor Dr. J. Knoop) gerechnet.

Da anhand der kleinen Zahl der untersuchten Personengruppen der Nachweis einer Normalverteilung nicht zu erbringen ist, erfolgt die statistische Absicherung der Ergebnisse mit nicht parametrischen Testverfahren.

Zum Vergleich gepaarter Werte (z.B. ATP-Werte des Kollektivs, die mit zwei verschiedenen Methoden ermittelt wurden) wird der WILCOXON-Test verwendet, zum Gruppenvergleich (z.B. ATP-Werte Patienten/ATP-Werte Gesunde) der U-Test nach WILCOXON, MANN und WHITNEY.

IV. Ergebnisse

1. Hämatologische und klinisch-chemische Daten

Die hämatologischen und klinisch-chemischen Daten des gesunden Kontroll-Kollektivs sind in den Tabellen 9 und 10 aufgeführt. Alle Daten der Gesunden liegen in den von RICK (1977) angegebenen Normbereichen.

Die Daten der terminal niereninsuffizienten Patienten gehen aus den Tabellen 11 und 12 hervor.

Die Patienten-Daten sind hochsignifikant unterschiedlich zu den Daten der gesunden Vergleichsgruppe. Die arithmetischen Mittelwerte der untersuchten Parameter von Gesunden und Patienten sowie die statistische Beurteilung sind Tabelle 13 zu entnehmen.

Die terminal niereninsuffizienten Patienten lagern Flüssigkeit im Körper ein, da sie nur wenig über die Nieren ausscheiden. Dies führt zu einer Vergrösserung des Extrazellulärraums, zu dem Blut und interstitielle Flüssigkeit gezählt werden. Alle Bestandteile des extrazellulären Raumes sind also in einem gegenüber der Norm vergrösserten Volumen gelöst. Ihre Konzentration pro Volumeneinheit ist somit geringer als bei Normovolämie. Dieser Verdünnungseffekt muss bei der Bewertung von Blut- bzw. Serum-Werten terminal niereninsuffizienter Patienten berücksichtigt werden. Besonders ausgeprägt sichtbar ist dieser Effekt bei den höher konzentrierten Bestandteilen des extrazellulären Raumes: z.B. bei der Erythrozytenzahl im Blut und der Natrium-Konzentration im Serum.

Erythrozytenzahl und Hämoglobin (Hb) sind gegenüber der Norm verringert bei normalem Quotienten Hämoglobin/Erythrozyt, so dass die Diagnose einer normochromen Anämie zu stellen ist. Dies bestätigt die mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration (MCHC), die im Normbereich liegt.

Tabelle 9: Hämatologische Daten der gesunden Kontrollgruppe

Name	Eryzahl $\frac{10^6}{\mu l \text{ Blut}}$	Hb $\frac{g}{100 \text{ ml Blut}}$	Hkt %	MCV μm^3	Hb_E 10^{-12} g	MCHC $\frac{g \text{ Hb}}{100 \text{ ml Erys}}$	Leukozahl $\frac{10^3}{\mu l \text{ Blut}}$
B.S.	4,6	13,3	39	86	29	34	7,3
K.F.	5,0	15,2	46	93	31	33	9,9
L.B.	5,7	16,5	49	86	29	34	8,3
L.L.	5,4	14,4	45	83	27	32	7,7
L.F.	5,4	16,6	49	90	31	34	8,0
M.T.	4,9	15,4	46	93	32	34	4,6
M.S.	4,3	13,5	41	95	31	33	8,7
P.J.	4,5	14,1	42	95	32	33	7,6
S.S.	5,0	15,7	47	94	32	34	7,7
W.L.	4,8	14,2	43	89	30	33	5,4

Tabelle 10: Klinisch-chemische Daten der gesunden Kontrollgruppe

Name	Harnstoff mg / 100 ml Serum	Kreatinin mg / 100 ml Serum	Natrium mval / l Serum	Kalium mval / l Serum	anorgan. Phosphat mg / 100 ml Serum
R.S.	16	0,8	137	4,1	3,9
K.F.	15	0,9	137	3,8	2,5
L.B.	13	0,8	144	4,2	3,8
L.L.	18	0,9	142	4,7	3,5
L.F.	18	1,0	142	4,2	2,4
H.T.	16	1,1	138	5,1	4,1
M.S.	17	1,1	133	-b)	4,3
F.J.	9	0,8	138	3,3	3,3
S.S.	14	0,9	138	3,9	3,3
W.L.	23	1,0	140	4,6	3,6

b) Serum hämolytisch

Tabelle 11: Hämatologische Daten der terminal niereninsuffizienten Patienten

Name	Eryzahl	Hb	Hkt	MCV	Hb_E	MCHC	Leukozahl
A.H.	2,9	9,4	27	93	32	35	5,3
B.C.	2,7	9,2	27	99	35	35	4,9
*G.J.	2,4	7,7	31	90	33	36	16,7a)
H.H.	2,1	7,7	22	105	36	35	31,7a)
H.M.	2,0	6,4	19	93	32	35	3,9
K.D.	2,1	6,6	19	-	-	-	-
K.K.	3,0	9,8	29	-	-	-	-
L.G.	2,6	8,4	25	97	33	34	6,7
P.H.	3,0	9,8	29	97	33	34	6,6
R.H.	2,7	8,7	25	95	33	35	10,8
*S.B.	3,2	9,4	28	88	30	34	10,4
S.K.	2,4	7,3	21	87	31	35	7,5
V.M.	1,8	6,0	17	-	-	-	-
W.H.	2,4	7,6	22	93	32	35	5,7

*) ø dialysierte Patienten

a) Daten nicht zur Berechnung des Mittelwertes hinzugezogen, Erläuterung s. Text

Tabelle 12: Klinisch-chemische Daten der terminal niereninsuffizienten Patienten

Name	Harnstoff	Kreatinin	Natrium	Kalium	anorgan.Pho.
A.H.	84	11,8	138	6,0	5,6
B.C.	42	6,6	132	5,0	5,4
*G.J.	183	13,5	132	4,9	10,1
H.H.	66	13,4	134	4,9	6,2
H.H.	80	13,8	136	5,5	5,1
K.D.	-	11,9	-	-	-
K.K.	-	5,4	-	-	-
L.G.	65	11,9	136	5,5	3,4
P.K.	76	17,1	137	5,3	4,6
R.B.	98	13,5	136	6,2	8,5
S.B.	132	13,6	145	3,7	8,9
S.K.	75	12,2	131	4,8	3,6
V.H.	-	10,3	-	-	-
W.H.	81	8,3	133	5,5	5,1

*) ø dialysierte Patienten

Tabelle 13

Hämatologische und klinisch-chemische Parameter: Arithmet. Mittelwerte und statistische Beurteilung

Kollektiv	Eryzahl	Hb	Hkt	MCV	Hb_E	MCHC	Leukozahl
Gesunde	5,0	14,9	44,7	90,4	30,4	33,4	7,5
alle Patienten	2,5	8,1	24,4	94,3	32,7	34,8	6,9
dial. Patienten	2,5	8,1	24,0	95,4	33,0	34,8	
⌀ dial. Patienten	2,8	8,6	29,5	89,0	31,5	35,0	
p (Gesunde/Pat.)	≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,001				

Kollektiv	Harnstoff	Kreatinin	Natrium	Kalium	anorg.Ph.
Gesunde	15,9	0,9	139	4,5	3,5
alle Patienten	89,3	11,7	136	5,2	6,1
dial. Patienten	74,1	11,4	135	5,4	5,3
⌀ dial. Patienten	157,6	13,6	139	4,3	9,5
p (Gesunde/Pat.)	≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,016	≤ 0,005	≤ 0,002

Unter Berücksichtigung des geschilderten Verdünnungseffektes hat die Anämie sicherlich eine geringere Ausprägung als aus den Zahlenwerten hervorgeht. Dies bestätigt die klinische Beobachtung, wonach terminal niereninsuffiziente Patienten mit Hb = 8 g% sich relativ wohlfühlen und eine geringe körperliche Belastung (Treppensteigen) ohne grössere Atemnot bewältigen können.

Der Hämatokrit ist stark erniedrigt. Dies ist durch die verminderte Zellzahl und die latente bzw. manifeste Überwässerung der Patienten zu erklären.

Die Leukozytenzahl ist meist im Normbereich. Die Patienten H.H. und G.J. haben erhöhte Zellzahlen bei nachgewiesenem Infekt. Ihre Leukozyten-Daten gehen daher nicht in die statistische Bewertung ein.

Die Kalium-Werte liegen zum grossen Teil im oberen Normbereich. Dies zeigt, dass die Dialyse-Behandlung effektiv ist und die Patienten sich an die angeordnete kaliumarme Diät halten.

Das anorganische Phosphat ist sehr viel höher als bei Gesunden. Die noch nicht dialysierten Patienten zeigen besonders hohe Werte. Der dialysierte Patient R.H. hat einen vergleichbar hohen Wert; er verstarb einige Tage nach der Blutentnahme an Herzversagen bei entgleistem Elektrolyt-Haushalt.

Die Natrium-Werte befinden sich an bzw. unterhalb der Normgrenze, da das gesamte Körpernatrium in einem gegenüber der Norm vergrösserten Verteilungsraum gelöst ist.

Aus den Elektrolyt-Konzentrationen im Serum ist jedoch kein direkter Rückschluss auf die Körperbestände an Natrium, Kalium und anorganischem Phosphat möglich, da bei den einzelnen Patienten verschieden viel Wasser

eingelagert ist. Ebenso kann aus den ermittelten Werten keine Aussage gemacht werden über die Relationen zwischen intra- und extrazellulärer Konzentration der Elektrolyte.

Die Harnstoff- und Kreatinin-Werte liegen bei den terminal niereninsuffizienten Patienten im stark pathologischen Bereich. Besonders bei den nicht dialysierten Patienten G.J. und S.B. sind die Werte extrem erhöht.

Das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV) der urämischen Erythrozyten ist gegenüber dem des Normalkollektivs erhöht. Dies ist vermutlich durch verschiedene Faktoren bedingt: zum einen durch die osmotisch (Harnstoff) verursachte Wassereinlagerung, zum anderen durch eine gestörte Membranfunktion (LANGEN 1979). Der in der Urämie veränderte Stoffwechsel der Erythrozyten könnte eine zusätzliche Rolle spielen.

Die Erythrozyten sind durch das dreimalige Waschen mit physiologischer NaCl-Lösung einer Belastung ausgesetzt. Um zu prüfen, wie die Zellen auf diese Manipulation reagieren, wird vor und nach dem Waschen das MCV der Erythrozyten gemessen. Die Einzelwerte von Patienten und Gesunden vor und nach Präparation sind in Tabelle 14 aufgeführt. Die entsprechenden arithmetischen Mittelwerte und die Spannweite der jeweiligen Einzelwerte gehen aus der folgenden Tabelle 15 hervor.

MCV vor/nach dreimaligem Waschen — Tabelle 15

	MCV in Vollblut	MCV in NaCl-Lösung
Patienten	94,3 (87-105)	98,1 (92-107)
Gesunde	90,4 (83- 95)	92,0 (85- 98)

Die Vergrösserung der Erythrozyten durch das dreimalige Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung ist sowohl bei Patienten als auch bei Gesunden nicht signifikant. Der Waschvorgang scheint also schonend für die Erythrozyten zu sein.

Tabelle 14

Vergleich des mittleren korpuskulären Volumens (MCV) der Erythrozyten in Vollblut und in NaCl-Lösung nach dreimaligem Waschen

Name	MCV in Vollblut	MCV in NaCl-Lsg.
Terminal niereninsuffiziente Patienten		
A.M.	93	97
B.C.	99	104
G.J.	90	94
H.H.	105	107
H.M.	93	100
L.G.	97	100
P.H.	97	100
R.H.	95	98
S.B.	88	93
S.K.	87	92
W.H.	93	94
Gesunde Kontrollgruppe		
B.S.	86	87
K.F.	93	94
L.B.	86	89
L.L.	83	85
L.F.	90	91
M.T.	93	94
M.S.	95	96
P.J.	95	98
S.S.	94	96
W.L.	89	90

2. Adenosin-Bestimmung mit der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Das Patienten-Kollektiv wird gebildet aus 10 terminal niereninsuffizienten Patienten, von denen 9 dialysiert werden. Die gesunde Vergleichsgruppe besteht aus 8 Probanden.

Im Plasma aller terminal niereninsuffizienten Patienten kann kein desoxy-Adenosin nachgewiesen werden.

Bei 2 Probanden der gesunden Kontrollgruppe findet sich desoxy-Adenosin im unteren Normbereich von (oxy)Adenosin. Bei den übrigen Gesunden ist - wie bei den Patienten - kein desoxy-Adenosin, sondern nur (oxy)Adenosin festzustellen.

Die (oxy)Adenosin-Konzentrationen in Plasma und Blut bei Patienten sowie gesunden Probanden sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Die Adenosin-Konzentration im Plasma wird direkt aus den Messdaten ermittelt (s. Methodik). Die Adenosin-Konzentration im Blut berechnet sich nach

Adenosin/ml Blut = Adenosin/ml Plasma · (100-Hk)/100.

Für die einzelnen Parameter sind jeweils Mittelwert sowie Spannweite der Einzelwerte aufgelistet (Tabellen 17 und 18).

Die Ergebnisse aller bzw. der dialysierten Patienten werden anschliessend verglichen mit den Daten der gesunden Probanden.

Adenosin-Bestimmung mit der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Tabelle 16

Terminal niereninsuffiziente Patienten

Name	Adenosin (10^{-12}mol) ml Plasma	Adenosin (10^{-12}mol) ml Blut
A.M.	146,81	107,17
B.C.	133,71	97,61
*G.J.	95,72	66,05
H.H.	77,41	60,38
H.M.	70,03	57,08
L.G.	121,63	91,22
P.H.	67,21	54,44
R.H.	59,27	44,45
S.K.	46,83	37,00
W.H.	42,68	33,30

*) ∅ dialysierter Patient

Gesunde Vergleichsgruppe

Name	Adenosin (10^{-12}mol) ml Plasma	Adenosin (10^{-12}mol) ml Blut
B.S.	102,45	62,50
L.B.	127,81	65,18
L.L.	72,31	42,52
L.F.	120,79	61,60
M.S.	202,19	119,29
P.J.	123,75	71,89
S.S.	72,17	38,25
W.L.	131,52	74,97

Adenosin (10^{-12} mol)
ml Plasma

Tabelle 17

Kollektiv	An-zahl	arithm. Mittelwert	Spannweite
Patienten	10	86,13	42,68 - 146,81
- dialysiert	9	85,06	42,68 - 146,81
- ø dialysiert	1	(95,72)	
Gesunde	8	119,12	72,17 - 202,19

Vergleich zwischen Patienten und Gesunden:

Patienten/Gesunde = 86,13 / 119,12 = 72 %
dial. Patienten/Gesunde = 85,06 / 119,12 = 71 %

Bei Patienten ist - bei Betrachtung der Mittelwerte - die Adenosin-Konzentration im Blutplasma um 28 bzw. 29 % geringer als bei der gesunden Kontrollgruppe.

Die statistische Überprüfung ergibt jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und Gesunden.

Adenosin (10^{-12} mol)
ml Blut

Tabelle 18

Kollektiv	An-zahl	arithm. Mittelwert	Spannweite
Patienten	10	64,87	33,30 - 107,17
- dialysiert	9	64,74	33,30 - 107,17
- ∅ dialysiert	1	(66,05)	
Gesunde	8	67,03	38,25 - 119,29

Vergleich zwischen Patienten und Gesunden:

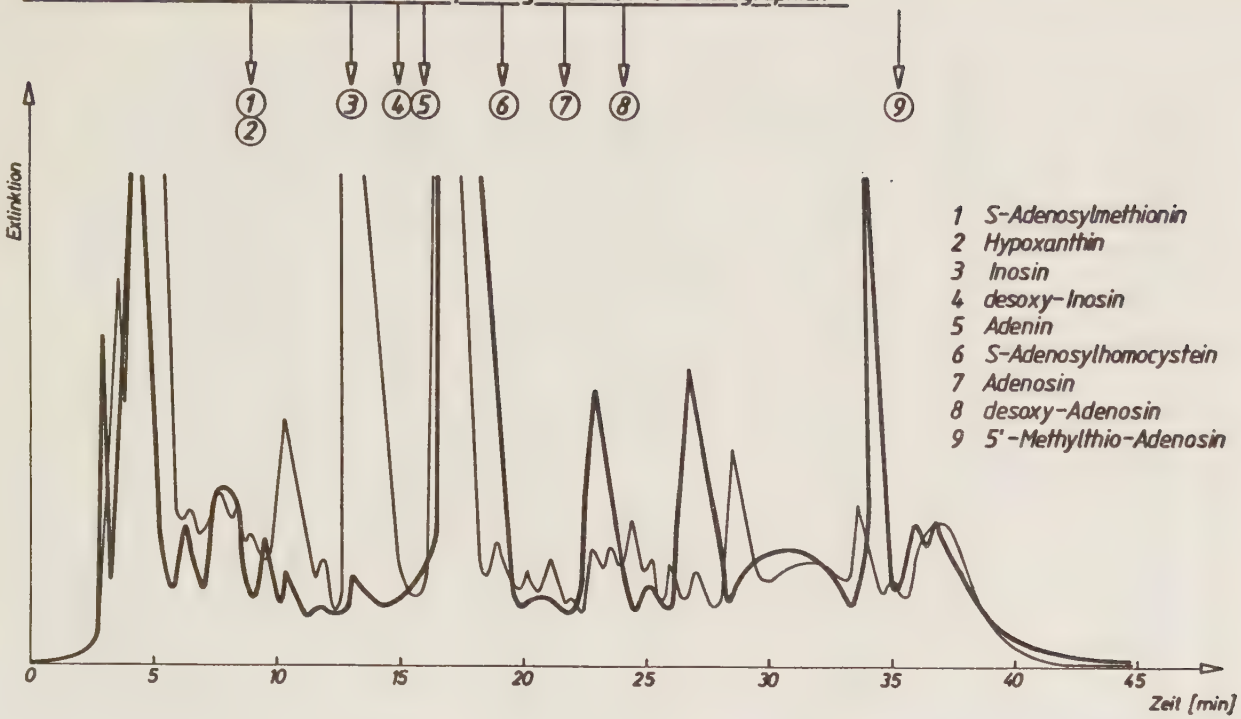
Patienten / Gesunde = 64,87 / 67,03 = 97 %
dial. Patienten / Gesunde = 64,74 / 67,03 = 97 %

Bei Patienten ist die Adenosin-Konzentration im Blut um 3 % geringer als bei der gesunden Kontrollgruppe. Diese Differenz ist jedoch nicht signifikant.

3. Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Wie aus den Summationskurven (Abb. 18) ersichtlich, zeigen die Chromatogramme aller Patienten einen hohen Peak, der bei den Gesunden kaum angedeutet vorhanden ist. Dieser Peak scheint im Inosin-Bereich lokalisiert zu sein; die Retentionszeit entspricht der von Inosin.

Es ist anzunehmen, dass der unbekannte Peak in den Patienten-Chromatogrammen nicht durch Medikamente bedingt ist. Der Peak ist in jedem Chromatogramm deutlich sichtbar, obwohl die Medikation der einzelnen Patienten verhältnismässig unterschiedliche Wirkstoffe umfasst. Die endgültige Identifizierung dieses Peaks ist durch weitere Analysen abzuklären.



urämische Patienten
gesunde Kontrollgruppe

Abb. 18
Summations-Chromatogramme
(Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie)

4. Dünnschicht-Chromatographie

Alle Chromatogramme zeigen eine Fluoreszenzlöschung im ATP-Bereich, was durch mitgelaufene Reinsubstanzen sowie Autoradiographien bestätigt wird.

Aus den Chromatogrammen ist unter Berücksichtigung von Verlust während der Präparation und aufgetragenem Probevolumen zu schätzen, dass die Patienten fast doppelt so hohe ATP-Konzentrationen in den Erythrozyten haben wie die gesunde Kontrollgruppe.

Die Dünnschicht-Chromatogramme werden insbesondere geprüft auf das Vorhandensein von dATP. Aber weder mit kleineren noch grösseren Probevolumina ist der Nachweis von dATP möglich.

Da sich die mitgelaufenen Reinsubstanzen (ATP und dATP) deutlich getrennt auf der Chromatographie-Platte darstellen und auch deutlich getrennt auf dem Autoradiographie-Film markieren lassen, kann gefolgert werden, dass die Methode zur Trennung von ATP und dATP geeignet ist. Die Tatsache, dass weder bei Patienten noch bei Gesunden dATP nachzuweisen ist, ist also nicht auf einen methodischen Fehler zurückzuführen.

Eine Beeinflussung der weiteren Untersuchungen durch dATP in zu ATP äquimolaren Konzentrationen kann somit ausgeschlossen werden.

Die Rf-Werte für ATP ergeben sich aus den Fleckmittelpunkten der aufgetragenen Proben. Die Rf-Werte für dATP sind lediglich über die mitgelaufenen Reinsubstanzen ermittelt worden, da kein dATP im Probenmaterial nachweisbar ist.

1. Laufrichtung ATP: Rf = 0,29; dATP: Rf = 0,29

2. Laufrichtung ATP: Rf = 0,35; dATP: Rf = 0,47

Nur bei Patienten ist eine zusätzliche Fluoreszenzlöschung zwischen Startpunkt und ATP-Bereich zu beobachten. Diese Lokalisation könnte GTP entsprechen, was aber im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeklärt wurde.

5. Säulen-Chromatographie

Das standardisierte Verfahren, das im Rahmen dieses Projektes neu entwickelt wurde, dient der quantitativen Trennung der oxy- von den desoxy-Nukleotiden. Wie im methodischen Teil ausgeführt, ist anschliessend aus den beiden Fraktionen der ATP- bzw. der dATP-Gehalt zu bestimmen.

Die Untersuchungen von gewaschenen Erythrozyten mit der Dünnschicht-Chromatographie ergeben keinen Anhalt für dATP. Es ist nur ATP nachzuweisen.

Aus diesem Grunde erübrigt sich eine Aufschlüsselung des Probenmaterials über die Säulen-Chromatographie. ATP kann also ohne Vortrennung direkt aus den Blutproben mit Hilfe von Phosphoglycerat-Kinase sowie Luciferin-Luciferase Methode bestimmt werden.

6. ATP-Bestimmung mit der Phosphoglycerat-Kinase Methode

ATP ist im Hämolysat von 14 terminal niereninsuffizienten Patienten und 7 gesunden Probanden gemessen worden. Von den terminal niereninsuffizienten Patienten werden 12 dialysiert.

Die Blutkonzentrationen von ATP werden über die jeweiligen Extinktionsdifferenzen ΔE (Formel s. Methodik) berechnet. Da ATP in den Erythrozyten lokalisiert ist, ergibt die Bezugnahme der ATP-Werte auf das Blut als Volumeneinheit bei der sehr unterschiedlichen Erythrozytenzahl der Probanden jedoch keine aussagekräftigen Daten.

Aus diesem Grund wird über die bekannten Daten Erythrozytenzahl/ml Blut und g Hb/ml Blut die ATP-Menge/Erythrozyt und die ATP-Menge/g Hb berechnet.

In Tabelle 19 (Patienten) und in Tabelle 20 (Gesunde) sind die Parameter ATP/ml Blut, ATP/Erythrozyt und ATP/g Hb aufgelistet unter Aufführung von Erythrozytenzahl/ml Blut und g Hb/ml Blut.

In dieser Arbeit wird die ATP-Konzentration sowohl pro Erythrozyt als auch pro g Hb berechnet, um herauszufinden, welcher Parameter bei terminal niereninsuffizienten Patienten Aussagekraft hat und grössere Korrelation zu anderen ermittelten Daten zeigt.

Terminal niereninsuffiziente Patienten

Enzymatische Bestimmung von ATP im Hämolysat mit der Phosphoglycerat-Kinase Methode Tab. 19

Name	ΔE (Mittelwert)	ATP (10^{-6} mol) / 100 ml Blut	g Hb / 100 ml Blut	ATP (10^{-6} mol) / g Hb	Ery (10^{9}) / 100 ml Blut	ATP (10^{-17} mol) / Erythrozyt
A.M.	0,0285	27,1	9,4	2,88	2,9	9,3
B.C.	0,0315	29,9	9,2	3,25	2,7	11,1
*G.J.	0,0515	48,9	7,7	6,35	2,4	20,4
H.H.	0,0545	51,8	7,7	6,73	2,1	24,7
H.M.	0,0300	28,5	6,4	4,45	2,0	14,3
K.D.	0,0240	22,8	6,6	3,46	2,1	10,9
K.K.	0,0430	40,9	9,8	4,17	3,0	13,6
L.G.	0,0290	27,6	8,4	3,29	2,6	10,6
P.H.	0,0400	38,0	8,8	4,32	3,0	12,7
R.H.	0,0345	32,8	8,7	3,77	2,7	12,2
*S.B.	0,0595	56,5	9,4	6,01	3,2	17,7
S.K.	0,0340	32,3	7,3	4,43	2,4	13,5
V.M.	0,0350	33,3	6,0	5,55	1,8	18,5
W.H.	0,0370	35,2	7,6	4,63	2,4	14,7

*) Ø dialysierte Patienten

Gesunde Kontrollgruppe

Enzymatische Bestimmung von ATP im Hämolysat mit der Phosphoglycerat-Kinase Methode

Tab. 20

Name	ΔE (Mittelwert)	ATP (10^{-6} mol) / 100 ml Blut	g Hb / 100 ml Blut	ATP (10^{-6} mol) / g Hb	Ery (10^{9}) / 100 ml Blut	ATP (10^{-17} mol) / Erythrozyt
B.S.	0,0400	38,0	13,3	2,86	4,6	8,3
K.F.	0,0460	43,7	15,2	2,88	5,0	8,7
L.B.	0,0240	22,8	16,5	1,38	5,7	4,0
M.T.	0,0175	16,6	15,4	1,08	4,9	3,4
P.J.	0,0675	61,4	14,1	4,36	4,5	13,6
S.S.	0,0440	41,8	15,7	2,66	5,0	8,4
W.L.	0,0340	32,3	14,2	2,28	4,8	6,7

Im folgenden werden jeweils arithmetischer Mittelwert und Spannweite der Parameter ATP/Erythrozyt (Tabelle 17) und ATP/g Hb (Tabelle 18) aufgezählt. Bei den Patienten sind die Ergebnisse zusätzlich aufgeschlüsselt nach dialysiertem und nicht dialysiertem Kollektiv.

ATP (mol^{-17})
Erythrozyt

ATP-Bestimmung mit der Phosphoglycerat-Kinase Methode

Tabelle 21

Kollektiv	An-zahl	arithm. Mittelwert	Spannweite
Patienten	14	14,59	9,3 - 24,7
- dialysiert	12	13,84	9,3 - 24,7
- ø dialysiert	2	19,05	17,7 - 20,4
Gesunde	7	7,59	3,4 - 13,6

Die Daten der Patienten werden mit denen der Gesunden verglichen:

Patienten / Gesunde = 14,59 / 7,59 = 192 % ***

dial. Patienten / Gesunde = 13,84 / 7,59 = 182 % **

ø dial. Patienten / Gesunde = 19,05 / 7,59 = 251 % *

Der ATP-Spiegel des Erythrozyten ist bei den Patienten um 92 % bzw. 82 % bzw. 151 % höher als bei der gesunden Kontrollgruppe (signifikant).

Bei allen statistischen Prüfungen wird verwendet:

* $p \leq 0,05$
** $p \leq 0,01$
*** $p \leq 0,001$

ATP (mol $^{-6}$) / g Hb

ATP-Bestimmung mit der Phosphoglycerat-Kinase Methode

Tabelle 22

Kollektiv	An-zahl	arithm. Mittelwert	Spannweite
Patienten	14	4,52	2,88 - 6,73
- dialysiert	12	4,24	2,88 - 6,73
- ø dialysiert	2	6,18	6,01 - 6,35
Gesunde	7	2,50	1,08 - 4,36

Vergleich der Mittelwerte von Patienten und Gesunden:

Patienten / Gesunde = 4,52 / 2,50 = 181 % ***

dial. Patienten / Gesunde = 4,24 / 2,50 = 170 % **

ø dial. Patienten / Gesunde = 6,18 / 2,50 = 247 % *

Die Patienten haben 81 % bzw. 70 % bzw. 147 % mehr ATP je g Hb als die gesunden Probanden. Diese Unterschiede sind signifikant.

Es ist gezeigt worden, dass in den Erythrozyten von Patienten fast doppelt soviel ATP vorhanden ist wie bei Gesunden. Diese Erhöhung ist besonders extrem bei den noch nicht dialysierten Patienten.

Dieses Ergebnis ist mit der Luciferin-Luciferase Methode überprüft worden.

7. Ergebnisse der ATP-Bestimmung mit der Luciferin-Luciferase Methode

Die gesunden und kranken Probanden, in deren Hämolysat ATP mit der Luciferin-Luciferase Methode bestimmt wurde, entsprechen dem Kollektiv zur ATP-Bestimmung mit der Phosphoglycerat-Kinase Methode.

Die ATP-Werte/ml Blut werden direkt aus den Messdaten ermittelt.

Unter Berücksichtigung der intraerythrozytären Lokalisation von ATP sowie der stark unterschiedlichen Erythrozytenzahlen der einzelnen Probanden sind die ATP-Werte/ml Blut schlecht direkt miteinander vergleichbar.

Um Daten mit guter Aussagekraft und Vergleichbarkeit zu erhalten, wird über die bekannten Angaben von Erythrozytenzahl/ml Blut und g Hb/ml Blut die ATP-Menge/Erythrozyt und die ATP-Menge/g Hb berechnet.

Die Werte der Patienten sind in Tabelle 23 aufgelistet. Die Daten der Gesunden gehen aus Tabelle 24 hervor.

Die statistische Auswertung von ATP/Erythrozyt (Tabelle 25) und ATP/g Hb (Tabelle 26) entspricht derjenigen bei der Phosphoglycerat-Kinase Methode.

Terminal niereninsuffiziente Patienten

Bestimmung von ATP im Hämolysat mit der Luciferin-Luciferase Methode

Tabelle 23

Name	ATP (10^{-6} mol) 100 ml Blut	g Hb 100 ml Blut	ATP (10^{-6} mol) g Hb	Ery (10^{6}) 100 ml Blut	ATP (10^{-17} mol) Erythrozyt
A.L.	38,92	9,4	4,14	2,9	13,4
E.C.	40,23	9,2	4,37	2,7	14,9
*G.J.	54,85	7,7	7,12	2,4	22,9
H.H.	51,23	7,7	6,69	2,1	24,4
H.M.	37,37	6,4	5,83	2,0	18,7
[illegible]	45,94	6,6	6,96	2,1	21,9
K.K.	39,28	9,8	4,01	3,0	13,1
L.G.	33,45	8,4	3,98	2,6	12,9
[illegible]	46,19	9,8	4,71	3,0	15,4
R.H.	56,87	8,7	6,54	2,7	21,1
[illegible]	71,69	9,4	7,63	3,2	22,4
S.K.	44,23	7,3	6,06	2,4	18.4
V.H.	33,92	6,0	5,65	1,8	18,8
W.H.	45,58	7,6	5,99	2,4	19,0

*) Ø dialysierte Patienten

Gesunde Kontrollgruppe

Bestimmung von ATP im Hämolysat mit der Luciferin-Luciferase Methode

Tabelle 24

Name	ATP (10^{-6} mol) / 100 ml Blut	g Hb / 100 ml Blut	ATP (10^{-6} mol) / g Hb	Ery (10^{9}) / 100 ml Blut	ATP (10^{-17} mol) / Erythrozyt
B.S.	39.23	13,3	2,94	4,6	8,5
K.F.	64,01	15,2	4,21	5,0	12,8
L.B.	52,52	16,5	3,18	5,7	9,1
M.T.	38,36	15,4	2,49	4,9	7,8
P.J.	54,42	14,1	3,86	4,5	12,1
S.S.	51,54	15,7	3,28	5,0	10,3
W.L.	47,17	14,2	3,22	4,8	9,8

ATP (mol^{-17}) Erythrozyt

ATP-Bestimmung mit der Luciferin-Luciferase Methode

Tabelle 25

Kollektiv	Anzahl	arithm. Mittelwert	Spannweite
Patienten	14	18,38	12,9 - 24,4
- dialysiert	12	17,67	12,9 - 24,4
- ø dialysiert	2	22,65	22,4 - 22,9
Gesunde	7	10,06	7,8 - 12,8

Vergleich zwischen Patienten und Gesunden:

Patienten / Gesunde = 18,38 / 10,06 = 183 % ***

dial. Patienten / Gesunde = 17,67 / 10,06 = 176 % ***

ø dial. Patienten / Gesunde = 22,65 / 10,06 = 225 % *

Der ATP-Spiegel des Erythrozyten ist bei Patienten um 83 % bzw. 76 % bzw. 125 % höher als bei der gesunden Kontrollgruppe. Diese Differenzen sind signifikant.

ATP (mol^{-6}) / g Hb

ATP-Bestimmung mit der Luciferin-Luciferase Methode

Tabelle 26

Kollektiv	An-zahl	arithm. Mittelwert	Spannweite
Patienten	14	5,69	3,98 - 7,63
- dialysiert	12	5,41	3,98 - 6,96
- ø dialysiert	2	7,38	7,12 - 7,63
Gesunde	7	3,21	2,49 - 4,21

Vergleich zwischen Patienten und Gesunden:

Patienten / Gesunde = 5,69 / 3,21 = 177 % ***

dial. Patienten / Gesunde = 5,41 / 3,21 = 169 % ***

ø dial. Patienten / Gesunde = 7,38 / 3,21 = 230 % *

Die Patienten haben 77 % bzw. 69 % bzw. 130 % mehr ATP je g Hb als die gesunden Probanden (signifikante Differenzen).

Zusammenfassend ist festzuhalten:

Bei Messung mit der Luciferin-Luciferase Methode zeigen sich ausgeprägte Erhöhungen der ATP-Spiegel bei den terminal niereninsuffizienten Patienten. Dieses Ergebnis bestätigt die Messungen mit der Phosphoglycerat-Kinase Methode.

Die beiden Methoden werden im nächsten Kapitel miteinander verglichen.

8. Vergleich der ATP-Werte von Phosphoglycerat-Kinase (PGK) Methode und Luciferin-Luciferase (LL) Methode

Die mit PGK- sowie LL-Methode ermittelten ATP-Werte wurden in den vorangegangenen Kapiteln getrennt nach Methoden besprochen. Nun sollen die ATP-Werte beider Methoden miteinander verglichen werden. Die jeweiligen arithmetischen Mittelwerte von Patienten und Gesunden sind in Tabelle 27 (ATP/Erythrozyt) und Tabelle 28 (ATP/g Hb) aufgelistet und zueinander in Relation gesetzt worden.

$\frac{\text{ATP } (\text{mol}^{-17})}{\text{Erythrozyt}}$

Tabelle 27

Kollektiv	arithm. Mittelwert (PGK)	(LL)	Mittelwert PGK / Mittelwert LL
Patienten	14,59	18,38	79 %
- dialysiert	13,84	17,67	78 %
Gesunde	7,59	10,06	75 %

$\frac{\text{ATP } (\text{mol}^{-6})}{\text{g Hb}}$

Tabelle 28

Kollektiv	arithm. Mittelwert (PGK)	(LL)	Mittelwert PGK / Mittelwert LL
Patienten	4,52	5,69	79 %
- dialysiert	4,24	5,41	78 %
Gesunde	2,50	3,21	78 %

Die ATP-Mittelwerte der PGK-Methode liegen ungefähr 20 % unter den Werten der LL-Methode.

Die Einzelwert-Paare (ATP,PGK/ATP,LL) des Gesamtkollektivs sind in Abbildung 19 (ATP/Erythrozyt) und Abbildung 20 (ATP/g Hb) im Koordinatensystem dargestellt. Die zu den jeweiligen Geradengleichungen gehörigen Kurven lassen sich nicht mit der Winkelhalbierenden zu Deckung bringen, was im Einklang mit der obigen Aussage steht.

Es zeigt sich zusätzlich, dass der Parameter ATP/Erythrozyt, der in der Literatur nicht allzu häufig verwendet wird, eine zumindest ebenso gute Korrelation ermöglicht wie der gebräuchlichere Ausdruck ATP/g Hb.

Obwohl bei Mittelwert-Vergleich die ATP-Werte (PGK) bei Patienten und Gesunden um 20 % niedriger liegen als die ATP-Werte (LL) sowie bei Patienten und Gesunden die Steigung der zu den Geradengleichungen gehörigen Kurven jeweils $\neq 1$ ist, unterscheiden sich nur bei den Patienten die mit beiden Methoden erhobenen ATP-Werte signifikant ($p = 0{,}005$). Die am gesunden Kollektiv mit den beiden Methoden gewonnenen ATP-Werte sind dahingegen nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0{,}061$ für ATP/Erythrozyt; $p = 0{,}087$ für ATP/g Hb).

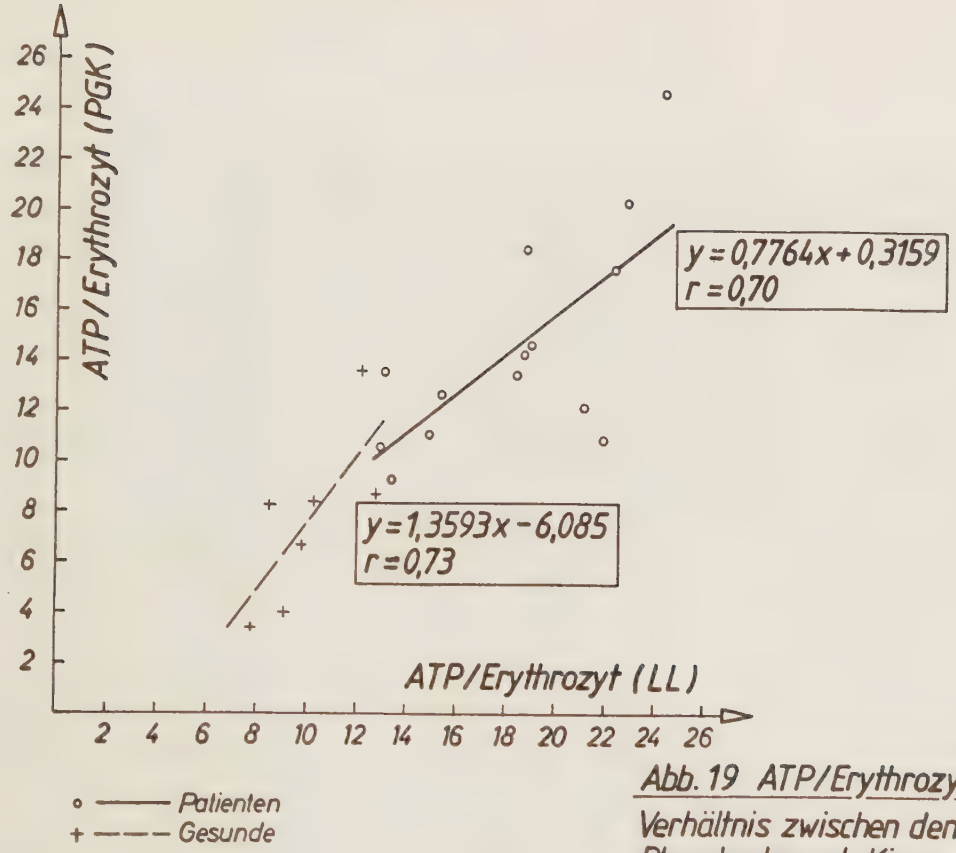


Abb. 19 ATP/Erythrozyt

Verhältnis zwischen den ATP-Werten von Phosphoglycerat-Kinase (PKG) und Luciferin-Luciferase (LL) Methode bei Patienten und Gesunden.

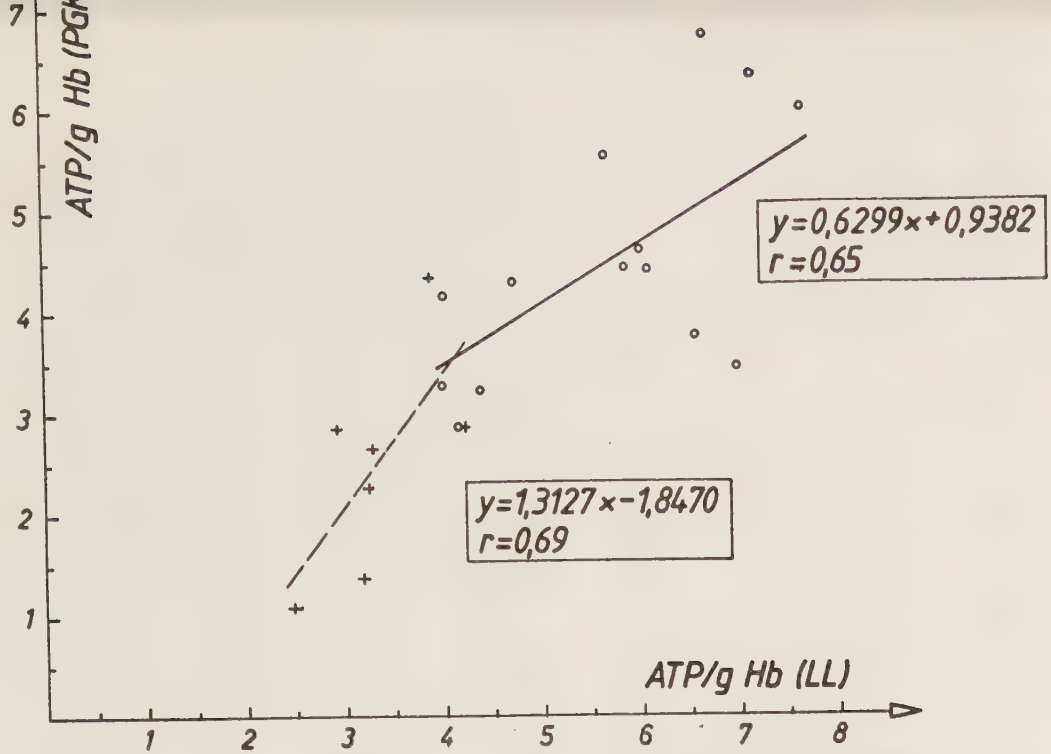


Abb. 20 ATP/g Hb

Verhältnis zwischen den ATP-Werten von Phosphoglycerat-Kinase (PGK) und Luciferin-Luciferase (LL) Methode bei Patienten und Gesunden.

9. Rechnerische Analyse (Korrelationen)

Die ATP-Werte von PGK- sowie LL-Methode und auch die Adenosin-Werte korrelieren weder bei Patienten noch bei Gesunden mit Harnstoff, Kreatinin, Natrium und Kalium, ausser

Pat.: ATP/gHb (LL) mit Harnstoff ($p=0,026$; $r= 0,6637$)
Pat.: ATP/gHb (PGK) mit Kalium ($p=0,034$; $r=-0,6390$)

Die ATP-Werte von Patienten und Gesunden, die mit der LL-Methode ermittelt wurden, zeigen mit anorganischem Phosphat folgende Korrelationen:

Pat.: ATP/Ery (LL) mit P_i ($p=0,019$; $r= 0,6888$)
Pat.: ATP/gHb (LL) mit P_i ($p=0,013$; $r= 0,7177$)
Ges.: ATP/Ery (LL) mit P_i ($p=0,002$; $r=-0,9355$)
Ges.: ATP/gHb (LL) mit P_i ($p=0,002$; $r=-0,9299$)

Diese Korrelationen sind bei Patienten positiv, bei Gesunden dahingegen negativ.

Die ATP-Werte von Patienten (LL-Methode) korrelieren folgendermassen mit Adenosin:

Pat.: ATP/gHb (LL) mit Adenosin/Plasma ($p=0,041$; $r=-0,6525$)
Pat.: ATP/gHb (LL) mit Adenosin/Blut ($p=0,025$; $r=-0,6988$)
Pat.: ATP/Ery (LL) mit Adenosin/Plasma ($p=0,097$) $r=-0,5536$)
Pat.: ATP/Ery (LL) mit Adenosin/Blut ($p=0,072$; $r=-0,5906$)

Nur die ATP-Werte/gHb sind signifikant unterschiedlich zu den Adenosin-Konzentrationen in Plasma und Blut.

Es ist auffällig, dass nur signifikante Korrelationen zwischen den ATP-Werten der LL-Methode und anorganischem Phosphat (bei Patienten und Gesunden) vorhanden sind sowie zwischen ATP (LL) und Adenosin (nur bei Patienten). Die ATP-Werte (PGK) sind nicht abhängig von anorganischem Phosphat bzw. Adenosin.

V. Diskussion

Das Krankheitsbild der terminalen Niereninsuffizienz (Urämie) ist als Vergiftung durch ein "Urämie-Toxin" aufzufassen, welches die pathologischen Veränderungen am Gesamtorganismus des Patienten bewirkt.

Adenosin wurde mit folgenden Argumenten als mögliches "Urämie-Toxin" postuliert:

1) In der Urämie ist die Konzentration an cAMP erhöht (SCHNEIDER 1978). cAMP wird zu Adenosin abgebaut über Enzyme, die an der Aussenseite der Zellmembran lokalisiert sind (HILZ und KAUKEL 1973, SCHNEIDER 1976, SNYDER et al. 1976, WOLFF und COOK 1977).
2) Adenosin ist niedermolekular und kann Zellmembranen penetrieren (BERLIN und OLIVER 1975, PATERSON et al. 1975, ROOS und PFLEGER 1972, SCHNEIDER 1976).
3) Adenosin zeigt viele toxische Effekte, die grösstenteils in vitro oder in Tierversuchen beobachtet wurden (FOX und KELLEY 1978), jedoch auch urämische Symptome erklären könnten.

Die urämische Proliferationshemmung liess Veränderungen im Stoffwechsel der am Kernaufbau beteiligten Substanzen vermuten, z.B. bei desoxy-Nukleotiden, desoxy-Nukleosiden und Nukleinsäure-Basen.

Mit den Untersuchungen dieser Arbeit sollte die Hypothese von Adenosin als "Urämie-Toxin" überprüft werden. Adenosin und seine Derivate wurden unter Berücksichtigung der jeweiligen desoxy-Substanzen analysiert.

In dieser Arbeit wurden bei 14 terminal niereninsuffizienten Patienten und 10 Gesunden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1) Messung der hämatologischen Parameter Erythrozytenzahl, Hb, Hkt, MCV und Leukozytenzahl sowie der klinisch-chemischen Parameter Harnstoff, Kreatinin, Natrium, Kalium und anorganisches Phosphat.

2) Übersicht über Verteilung der Nukleoside und Nukleinsäure-Basen im Blutplasma.

3) Bestimmung der oxy- und desoxy-Adenosin-Konzentrationen in Plasma und Blut (Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie).

4) Übersicht über die Trinukleotid-Verteilung in den Erythrozyten; Ausschluss von desoxy-ATP (Dünnschicht-Chromatographie).

5) Bestimmung von ATP in Erythrozyten mit der
   a) Phosphoglycerat-Kinase (PGK) Methode
   b) Luciferin-Luciferase (LL) Methode.

6) Vergleich der ATP-Werte beider Methoden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden statistisch abgesichert.

Die hämatologischen sowie klinisch-chemischen Parameter sind (bis auf Leukozytenzahl und MCV) bei Patienten pathologisch und hochsignifikant unterschiedlich zu den Daten der Gesunden.

Das Hochdruck-Flüssigkeits-chromatographische Verfahren, welches Vorkommen und Verteilung von Nukleosiden und Nukleinsäure-Basen im Plasma terminal niereninsuffizienter Patienten sowie der gesunden Kontrollgruppe analysierte, zeigte im Plasma aller urämischen Patienten einen gegenüber den Gesunden stark erhöhten Peak, der vermutlich auf erhöhte Inosin-Spiegel zurückzuführen ist. Eine weitergehende Analyse dieses Peak-Bereiches wurde nicht durchgeführt, so dass eine endgültige Bewertung nicht erfolgen kann. Eine Gas-chromatographische Untersuchung des fraglichen Bereiches ist angestrebt.

Bei terminal niereninsuffizienten Patienten wurde kein d-Adenosin gefunden. Im Plasma zweier Personen der gesunden Kontrollgruppe war d-Adenosin (mengenmässig im unteren Normbereich von (oxy)Adenosin) vorhanden. Diesem Phänomen wurde jedoch nicht weiter nachgegangen.

Für (oxy)Adenosin finden sich folgende Konzentrationen in Plasma und Blut:

Patienten: 86,13 mol^{-12}/ml Plasma; 64,87 mol^{-12}/ml Blut

Gesunde: 119,12 mol^{-12}/ml Plasma; 67,03 mol^{-12}/ml Blut

Diese Werte sind nicht signifikant unterschiedlich.

Die in der Literatur angegebenen Normalwerte bei Gesunden (Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie) schwanken zwischen z.B. 70 $\pm$ 30 (SCHMALSTIEG et al. 1978) und 310 $\pm$ 290 mol^{-12}/ml Plasma (MILLS et al. 1976). Die in dieser Arbeit ermittelten Werte liegen im entsprechenden Bereich. Die starken Schwankungen zwischen den einzelnen Angaben können auf unterschiedliche Probenvorbereitung und quantifizierende Zusatzmethoden zurückzuführen sein.

Über die Adenosin-Spiegel terminal niereninsuffizienter Patienten liegen in der Literatur keine Angaben vor, so dass die hier ermittelten Werte ohne Vergleich bleiben müssen.

Mit einer semi-quantitativen Dünnschicht-chromatographischen Methode konnte festgestellt werden, dass die ATP-Spiegel bei terminal niereninsuffizienten Patienten ungefähr doppelt so hoch wie bei der gesunden Kontrollgruppe waren.

dATP war nicht nachzuweisen. Aus diesem Grund brauchte erstens eine quantitative Vortrennung des Untersuchungsmaterials in oxy- und desoxy-Nukleotide durch eine für diese Arbeit entwickelte Säulen-chromatographische Methode nicht durchgeführt zu werden. Zweitens war eine Beeinflussung der nachfolgenden quantitativen ATP-Bestimmung durch dATP (in zu ATP äquimolarer Konzentration) ausgeschlossen.

ATP wurde mit der Phosphoglycerat-Kinase (PGK) und der Luciferin-Luciferase (LL) Methode im Hämolysat terminal niereninsuffizienter Patienten und der gesunden Kontrollgruppe bestimmt. Da ATP nur intrazellulär lokalisiert

ist, sind aus den Blutwerten die ATP-Konzentrationen der Erythrozyten zu errechnen.

ATP (mol^{-17}/Erythrozyt)

PGK:	Patienten	14,59;	Gesunde	7,59;	p≤0,001
LL:	Patienten	18,38;	Gesunde	10,06;	p≤0,001

ATP (mol^{-6}/g Hb)

PGK:	Patienten	4,52;	Gesunde	2,50;	p≤0,001
LL:	Patienten	5,69;	Gesunde	3,21;	p≤0,001

Die terminal niereninsuffizienten Patienten zeigen ungefähr doppelt so hohe ATP-Spiegel in den Erythrozyten wie die gesunde Kontrollgruppe. Diese Unterschiede sind hochsignifikant.

Diese quantitativen ATP-Bestimmungen mit PGK- und LL-Methode bestätigen die o.g. semi-quantitativen Ergebnisse (Dünnschicht-Chromatographie).

Die mit beiden Methoden ermittelten ATP-Werte der gesunden Kontrollgruppe werden weitgehend durch die Ergebnisse anderer Untersuchungen bestätigt (Übersicht bei BEUTLER und MATHAI 1967).

ATP-Werte von terminal niereninsuffizienten Patienten, die mit der PGK-Methode ermittelt wurden, sind in der Literatur nicht beschrieben, so dass die hier ermittelten Werte nicht mit den Ergebnissen anderer Autoren vergleichbar sind.

Die mit der LL-Methode ermittelten ATP-Werte sind mit den Angaben von PLANKER (1980) zu vergleichen: 4,69 $\pm$ 0,14 mol ATP/g Hb bei terminal niereninsuffizienten Patienten und 3,65 $\pm$ 0,12 bei der gesunden Kontrollgruppe.

Der in dieser Arbeit bestimmte Patienten-Mittelwert liegt über dem Wert von PLANKER. Dies könnte zurückzuführen sein auf ein unterschiedlich zusammengesetztes Patienten-Kollektiv: PLANKER schloss in die Untersuchungen Patienten mit akut entstandener Niereninsuf-

fizienz (z.B. nach Intoxikationen) mit ein, während in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich Patienten mit schon längerer Dialyse-Therapie, die z.T. erhebliche zusätzliche Erkrankungen aufwiesen, untersucht wurden.

Der hier ermittelte ATP-Mittelwert des gesunden Kollektivs stimmt dahingegen mit dem von PLANKER überein.

KRAMER et al. (1972 und 1976) berichten über ATP-Konzentrationen (mol^{-3}/l Erys) von 2,4 bzw. 2,13 bei terminal niereninsuffizienten Patienten gegenüber 1,4 bzw. 1,32 bei der gesunden Kontrollgruppe. Da diese Werte wegen fehlender Angabe weiterer hämatologischer Parameter nicht auf mol/Ery oder mol/g Hb umzurechnen sind, können sie nicht numerisch mit den in dieser Arbeit ermittelten ATP-Werten verglichen werden. Die ATP-Werte der Patienten in der Untersuchung von KRAMER et al. sind um 66 % gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, was in der Tendenz den in dieser Arbeit gefundenen fast doppelt so hohen ATP-Werten bei Patienten im Vergleich zu Gesunden entspricht.

Durch die erhöhten ATP-Spiegel in den Erythrozyten terminal niereninsuffizienter Patienten ist die Hemmung von Hexokinase und Phosphofructokinase (DZURIK et al. 1971) zu erklären. Die verminderte Glukose-Utilisation in der Urämie (COHEN 1962, TEUSCHER 1964, WESTERVELT und SCHREINER 1962) kann durch diese Enzymhemmung mitbedingt sein, da hauptsächlich Hexokinase und Phosphofructokinase die Flussrate der Glykolyse bestimmen.

ATP (LL) zeigt mit anorganischem Phosphat bei terminal niereninsuffizienten Patienten eine positive Korrelation, bei Gesunden dagegen eine negative Korrelation. Eine Erklärung hierfür kann nicht gegeben werden.

Ein Vergleich der ATP-Werte, die mit der Phosphoglycerat-Kinase (PGK) sowie der Luciferin-Luciferase (LL) Methode bestimmt wurden, erbrachte folgendes:

Bei terminal niereninsuffizienten Patienten sind die ATP-Werte (PGK) signifikant kleiner als die der LL-Methode. Die ATP-Werte des gesunden Vergleichs-Kollektivs sind jedoch nicht signifikant unterschiedlich.

Eine Enzymhemmung der PGK-Methode beim Einsatz im urämischen Milieu ist zu diskutieren. Die Tatsache, dass fast immer nur ATP-Werte (LL) mit anderen Parametern korrelieren, dürfte ebenfalls in diesem Sinne zu deuten sein. Diese Vermutungen sollten jedoch mit einer grösseren Probandenzahl als in dieser Arbeit überprüft werden.

In dieser Arbeit wurden - kurz zusammengefasst - hauptsächlich folgende Ergebnisse erzielt:

Bei terminal niereninsuffizienten Patienten waren kein desoxy-Adenosin im Blutplasma sowie kein desoxy-ATP in Erythrozyten nachzuweisen. Die plasmatische (oxy)Adenosin-Konzentration der Patientengruppe ist nicht signifikant unterschiedlich zu der des gesunden Kollektivs. Die (oxy)ATP-Konzentration in Erythrozyten ist bei Patienten fast doppelt so hoch wie bei Gesunden (hochsignifikant).

Die erhöhte plasmatische cAMP-Konzentration der terminal niereninsuffizienten Patienten führt also nicht zu einer plasmatischen Konzentrations-Erhöhung von Adenosin. Falls Adenosin ein "Urämie-Toxin" ist, zeigt es jedenfalls keinen erhöhten Blutplasma-Spiegel.

Es ist aber nicht auszuschliessen, dass Adenosin vermehrt von den Erythrozyten der terminal niereninsuffizienten Patienten aufgenommen und zu ATP phosphoryliert wird. Die erhöhte ATP-Konzentration der urämischen Erythrozyten könnte hieraus resultieren. Diese Interpretation der Ergebnisse wird durch die bei Patienten negative Korrelation zwischen ATP und Adenosin gestützt. Für einen vermehrten Adenosin-Durchsatz bei terminal niereninsuffizienten Patienten könnte auch

der sehr hohe Inosin-Peak in den Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatogrammen sprechen.

Zur Absicherung der o.g. Hypothesen sollte die Dynamik des Adenosin-Stoffwechsels bei terminal niereninsuffizienten Patienten untersucht werden. Hierzu könnte z.B. Blut urämischer Patienten mit radioaktiv markiertem Adenosin inkubiert und die Umbauraten von Adenosin zu ATP und Inosin bestimmt werden.

Es bleibt anzumerken, dass Adenosin und ATP zumeist nicht mit den üblichen klinisch-chemischen Parametern der Niereninsuffizienz wie Harnstoff, Kreatinin, Natrium und Kalium korrelieren. Die Höhe der ATP- und Adenosin-Spiegel scheint also nicht mit dem Grad der Niereninsuffizienz parallel zu gehen.

VI. Zusammenfassung

Das Krankheitsbild der terminalen Niereninsuffizienz (Urämie) kann als Vergiftung durch ein "Urämie-Toxin" aufgefasst werden, welches die pathologischen Veränderungen am Gesamtorganismus des Patienten bewirkt. In der vorliegenden Arbeit wird die Bedeutung von Adenosin als mögliches "Urämie-Toxin" diskutiert.

An Blutproben terminal niereninsuffizienter Patienten und einer gesunden Vergleichsgruppe werden hämatologische und klinisch-chemische Parameter sowie die Spiegel von Adenosin und ATP - unter Berücksichtigung der entsprechenden desoxy-Substanzen - analysiert.

Nach standardisierter Entnahme und Vorbereitung der Proben werden folgende Methoden angewendet:

1. Dünnschicht-Chromatographie zur Übersicht über die Verteilung der oxy- und desoxy-Trinukleotide in Erythrozyten und zur semi-quantitativen Bestimmung von ATP.
2. Säulen-Chromatographie zur quantitativen Trennung in oxy- und desoxy-Nukleotide.
3. Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie zur Übersicht über die Verteilung der Nukleoside und Nukleinsäure-Basen im Blutplasma sowie zur quantitativen Bestimmung von Adenosin.
4. Phosphoglycerat-Kinase Methode zur quantitativen Bestimmung von oxy- und desoxy-ATP nach eingehenden methodischen Voruntersuchungen.
5. Luciferin-Luciferase Methode zur quantitativen Bestimmung von (oxy)ATP.

Die Aussagekraft von 4. und 5. wird miteinander verglichen.

Es werden folgende Ergebnisse erzielt:

Die hämatologischen Parameter Erythrozytenzahl, Hb, Hk sowie die klinisch-chemischen Parameter Harnstoff, Kreatinin, Natrium, Kalium und anorganisches Phosphat sind bei terminal niereninsuffizienten Patienten pathologisch und signifikant unterschiedlich zu den Daten der gesunden Vergleichsgruppe.

Bei terminal niereninsuffizienten Patienten sind weder desoxy-Adenosin im Blutplasma noch desoxy-ATP in den Erythrozyten nachweisbar.

Die plasmatische (oxy)Adenosin-Konzentration der terminal niereninsuffienten Patienten ist nicht signifikant unterschiedlich zu der des gesunden Kollektivs.

Bei den Patienten scheint Inosin im Blutplasma stark erhöht zu sein, was durch weiterführende Untersuchung noch endgültig abzusichern ist.

Die (oxy)ATP-Konzentration der Erythrozyten ist bei den Patienten fast doppelt so hoch wie bei den Gesunden. Dieser Unterschied ist signifikant.

Durch die erhöhten ATP-Spiegel in den Erythrozyten terminal niereninsuffizienter Patienten ist die verminderte Glukose-Utilisation in der Urämie zu erklären: erhöhte ATP-Spiegel hemmen Hexokinase und Phosphofructokinase, also die Enzyme, die die Flussrate der Glykolyse bestimmen.

Adenosin, welches als "Urämie-Toxin" postuliert wird, hat in der Urämie keinen erhöhten Blutplasma-Spiegel, könnte jedoch vermehrt von den Erythrozyten terminal niereninsuffizienter Patienten aufgenommen und zu ATP phosphoryliert werden. Diese Interpretation wird durch die erhöhten ATP-Konzentrationen in urämischen Erythrozyten gestützt sowie durch die negative Korrelation zwischen ATP und Adenosin bei den Patienten. Für einen in der Urämie vermehrten Adenosin-Durchsatz könnte auch der sehr hohe Inosin-Spiegel sprechen.

VI. Literatur-Verzeichnis

BERLIN, R.D., J.M. OLIVER:

Membrane transport of purine and pyrimidine bases and nucleosides in animal cells.

Int. Rev. Cytol. 42: 287-336 (1975)

BEUTLER, E., C.K. MATHAI:

A comparison of normal red cell ATP levels as measured by the firefly system and the hexokinase system.

Blood 30: 311-320 (1967)

BOEHRINGER Mannheim GmbH Diagnostica (Hrsg.):

Enzymatische Bestimmung der Konzentration von Adenosin-5'-triphosphat im Blut.

Test Fibel ATP (1978)

BOESEKAN, J.:

The use of boric acid for the determination of the configuration of carbohydrates.

Advan. Carbohyd. Chem. 4: 189-210 (1949)

BÜCHER, T.:

Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment.

Biochim. Biophys. Acta 1: 292-314 (1947)

BYUUM, J.W., E. VOLKIN:

Wasting of 18 S ribosomal RNA by human myeloma cells cultured in adenosine.

J. Cell. Physiol. 88: 197-206 (1976)

COHEN, B.D.:

Abnormal carbohydrate metabolism in uraemia.

Ann. Int. Med. 57: 204-213 (1962)

CONNER, J.M., V.C. BULGRIN:

Equilibria between borate ion and some polyols in aqueous solution.

J. Inorg. Nucl. Chem. 29: 1953-1961 (1967)

DZÚRIK, R., V. HUPKOVÁ, J. HOLOMÁŇ, E. VALORIČOVÁ:
Abnormal carbohydrate metabolism in uraemia.
Int. Urol. Nephrol. 3: 409-413 (1971)

FONTENELLE, L.J., J.F. HENDERSON:
An enzymatic basis for the inability of erythrocytes to synthesize purine ribonucleotides de novo.
Biochim. Biophys. Acta 177: 175-176 (1969)

FOX, I.H., W.N. KELLEY:
The role of adenosine and 2'-desoxy-adenosine in mammalian cells.
Annu. Rev. Biochem. 47: 655-686 (1978)

GESSLER, U., H. MÜLLER, W. SCHULZ:
Urämie.
in: Nierenkrankheiten.
Hrsg. von H. Sarre
4. Aufl.
Stuttgart, Thieme (1976)

GRANTHAM, J.J., F. WHITTIER, D. DIEDERICH:
Uremia: Strategies in the search for toxins.
in: Physiology of membrane disorders.
Hrsg. von T.E. Andreoli, J.F. Hoffmann, D.D. Fanestril
New York, London, Plenum Book Company (1978)

GREEN, H., T. CHAN:
Pyrimidine starvation induced by adenosine in fibroblasts and lymphoid cells: Role of adenosine deaminase.
Science 182: 836-837 (1973)

GRUBER, W., M. MOELLERING, H.U. BERGMEYER:
Analytische Differenzierung von Purin- und Pyrimidin-Nucleotiden.
1. Bestimmung von AMP, ADP und ATP sowie GTP + ITP.
Enzym. Biol. Clin. 7: 115-129 (1966)

HAGEMAN, J.H.:
Assay of adenylate cyclase by use of polyacrylamide-boronate gel columns.
Anal. Biochem. 80: 547-554 (1977)

HILZ, H., E. KAUKEL:

Divergent action mechanism of cAMP and dibutyril cAMP on cell proliferation and macromolecular synthesis in HeLa S3 cultures.

Mol. Cell. Biochem. 1: 229-239 (1973)

ISHII, K., H. GREEN:

Lethality of adenosine for cultured mammalian cells by interference with pyrimidine biosynthesis.

J. Cell. Sci. 13: 429-439 (1973)

JAWOREK, D., W. GRUBER, H.D. BERGMEYER:

Adenosin-5'-triphosphat: Bestimmung mit 3-Phosphoglycerat-Kinase.
in: Methoden der enzymatischen Analyse.
Hrsg. von H.U. Bergmeyer
2. Aufl., Bd. 2
Weinheim /Bergstrasse, Verlag Chemie (1970)

KHYM, J.X.:

The use of the borate complex.
in: Methods in Enzymology.
Hrsg. von L. Grossmann, K. Moldave
Bd. 12, A
New York, London, Academic Press (1967)

KRAMER, H.J., D. GOSPODINOW, F. KRÜCK:

Hemmung der Transport-ATPase bei chronischer Niereninsuffizienz.

Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 78: 1597-1601 (1972)

KRAMER, H.J., D. GOSPODINOW, F. KRÜCK:

Functional and metabolic studies on red blood cell sodium transport in chronic uremia.

Nephron 16: 344-358 (1976)

MEYSKENS, F.L., H.E. WILLIAMS:

Adenosine metabolism in human erythrocytes.

Biochim. Biophys. Acta 240: 170-179 (1971)

MILLS, G.C., F.C. SCHMALSTIEG, K.B. TRIMMER, A.S. GOLDMAN, R.M. GOLDBLUM:

Purine metabolism in adenosine deaminase deficiency.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 2867-2871 (1976)

NEUHARD, J., A. MUNCH-PETERSEN:

Studies on the acid-soluble nucleotide pools in thymine-requiring mutants of Escherichia coli during thymine starvation.
II. Changes in the amounts of deoxycytidine triphosphate and deoxyadenosine triphosphate in Escherichia coli 15 T-A-U.

Biochim. Biophys. Acta 114: 61-71 (1966)

PASTAN, I.H., G.S. JOHNSON, W.B. ANDERSON:

Role of cyclic nucleotides in growth control.

Annu. Rev. Biochem. 44: 491-522 (1975)

PATERSON, A.R.P., S.C. KIM, O. BERNARD, C.E. CASS:

Transport of nucleosides.

Ann. NY Acad. Sci. 255: 402-410 (1975)

PLANKER, M., E. SCHNURR, W. SCHNEIDER:

Zur Veröffentlichung vorgesehen.

RALPH, R.K., H.G. KHORANA:

Studies on polynucleotides. XI. Chemical polymerisation of mononucleotides. The synthesis and characterization of deoxyadenosine polynucleotides.

J. Amer. Chem. Soc. 83: 2926-2937 (1961)

RANDERATH, K.:

Dünnschichtchromatographie an Ionenaustauscher-Schichten. Trennung von Nucleinsäure - Derivaten.

Angew. Chem. 73: 674-676 (1961)

RANDERATH, K.:

Ein einfaches Herstellungsverfahren für Celluloseanionenaustauscher und Anionenaustauscherpapiere.

Angew. Chem. 74: 780 (1962)

RANDERATH, K.:

Separation of deoxyribonucleotides from ribonucleotides by anion-exchange thin-layer chromatography.

Biochim. Biophys. Acta 76: 622-624 (1963)

RANDERATH, K., E. RANDERATH:

Ion-exchange chromatography of nucleotides on poly-(ethyleneimine)-cellulose thin layers.

J. Chromatogr. 16: 111-125 (1964)

RANDERATH, K., H. STRUCK:

Dünnschichtchromatographische Trennung von Nucleinsäure-Derivaten an Celluloseschichten.

J. Chromatogr. 6: 365-367 (1961)

RICK, W.:

Klinische Chemie und Mikroskopie.

5. Aufl.
Berlin, Heidelberg, New York, Springer (1977)

ROOS, H., K. PFLEGER:

Kinetics of adenosine uptake by erythrocytes, and the influence of Dipyridamol.

Mol. Pharmacol. 8: 417-425 (1972)

SCHMALSTIEG, F.C., J.F. KUTTESCH, J.A. NELSON:

Analysis of adenosine and other adenine compounds in patients with immunodeficiency diseases.

J. Liquid Chrom. 1: 97-109 (1978)

SCHNEIDER, W.:

Beeinflussung des Glykogengehaltes menschlicher Blutplättchen durch Prostaglandin E_1, dibutyriliertes zyklisches AMP und Adenosin.
in: Die Rolle der Blutplättchen bei der Thrombose. Das Problem der Hyperkoagulabilität.

Hrsg. von E.F. Lüscher
Stuttgart, Schattauer (1976)

SCHNEIDER, W.:

Zur Pathogenese der urämischen Thrombozytopenie.
in: Niere, Blutgerinnung und Hämostase.

Hrsg. von R. Marx, H.A. Thies
Stuttgart, New York, Schattauer (1978)

SCHOTT, H., E. RUDLOFF, P. SCHMIDT, R. ROYCHOUDHURY, H. KOSSEL:

A dihydroxyboryl-substituted methacrylic polymer for the column chromatographic separation of mononucleotides, oligonucleotides, and transfer ribonucleic acid.

Biochemistry 12: 932-938 (1973)

SCHRADER, W.:
Mündliche Mitteilung (1979)

SIEBERT, H.-G.:
Erkrankungen der Niere.
in: Lehrbuch der Inneren Medizin.
Hrsg. von R. Gross, P. Schölmerich
5. Aufl.
Stuttgart, New York, Schattauer (1977)

SNYDER, F.F., J.F. HENDERSON:
Alternative pathways of deoxyadenosine and adenosine metabolism.
J. Biol. Chem. 248: 5899-5904 (1973)

SNYDER, F.F., J.E. SEEGMILLER:
The adenosine-like effect of exogenous cyclic AMP upon nucleotide and PP-ribose-P concentrations of cultured human lymphoblasts.
FEBS Lett. 66: 102-106 (1976)

STREHLER, B.L.:
Adenosin-5'-triphosphat und Creatinphosphat: Bestimmung mit Luciferase.
in: Methoden der enzymatischen Analyse.
Hrsg. von H.U. Bergmeyer
2. Aufl. Bd. 2
Weinheim /Bergstrasse, Verlag Chemie (1970)

TEUSCHER, A.:
Beurteilung der Blutzuckerwerte und der Glukosetoleranz bei Urämie.
Schweiz. Med. Wschr. 94: 69-74 (1964)

TSUBOI, K.K., T.D. PRICE:
Isolation, detection and measure of microgram quantities of labeled tissue nucleotides.
Arch. Biochem. Biophys. 81: 223-237 (1959)

UZIEL, M., L.H. SMITH, S.A. TAYLOR:
Modified nucleosides in urine: Selective removal and analysis.
Clin. Chem. 22: 1451-1455 (1976)

WEISS, L., G. LÖFFLER, P.E. PETRIDES:

Hormone.
in: Physiologische Chemie.
Hrsg. von H.A. Harper, G. Löffler,
P.E. Petrides, L. Weiss
Berlin, Heidelberg, New York, Springer (1975)

WESTERVELT, B.F.Jr., G.E. SCHREINER:

The carbohydrate intolerance of uremic patients.
Ann. Int. Med. 57: 266-276 (1962)

WOLFF, J., G.H. COOK:

Activation of steroidgenesis and adenylate cyclase by adenosine in adrenal and Leydig tumor cells.
J. Biol. Chem. 252: 687-693 (1977)

Nachtrag

LANGEN, H.:

Veränderungen des Natrium-, Kalium-, Harnstoff- und Wassergehaltes im Plasma und in den Erythrozyten bei terminal niereninsuffizienten Patienten während der Hämodialyse.
Inaugural-Dissertation, Düsseldorf (1979)

Meinem verehrten Doktorvater, Herrn Professor Dr.med. W. Schneider, Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Düsseldorf, Klinik A, danke ich für Ausbildung, Themenstellung, Förderung und Betreuung.

Herrn Professor Dr.med. W. Rick, Direktor des Zentralinstitutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, ist Dank auszusprechen für wesentliche Ratschläge sowie für die Überlassung der Ergebnisse der Routine-Untersuchungen bei den nephrologischen Patienten und das Ermöglichen der entsprechenden Untersuchungen beim gesunden Vergleichskollektiv.

Herrn Professor Dr.med. E. Schnurr, Medizinische Klinik und Poliklinik der Universität Düsseldorf, Klinik A, wird für die Beratung in Fragen der Statistik gedankt; ihm und seinen Mitarbeiterinnen im nephrologischen Labor sowie Fräulein E. Freiberger im hämatologischen Labor (Leitung Professor Dr.med. W. Schneider) danke ich für praktische Hinweise.

Herrn Professor Dr.med. W. Schrader, Physiologisches Institut der Universität München, ist für die Durchführung der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie zu danken.

Für die praktische Einführung in die Luciferin-Luciferase Methode wird Herrn Dr.med. Planker, Medizinische Klinik und Poliklinik der Universität Düsseldorf, Klinik A, gedankt.

Lebenslauf

17.11.1956	Geboren als Tochter von Dr.rer.pol. Wilhelm Lorenz, Ingenieur und Diplom-Kaufmann, und Wilhelmine Lorenz, geb. Kamp, Diplom-Kaufmann, zu Düsseldorf
1963 - 1975	Volksschule und Gymnasium (Abitur) in Neuss
ab WS. 1975	Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf
August 1977	Physikum
August 1978	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
März 1981	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
ab April 1981	Praktisches Jahr Universitätsklinik Düsseldorf: Anästhesie Heilig Geist-Hospital Kempen: Innere und Chirurgie
April 1982	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
ab WS. 1978	Dissertation an der Medizinischen Klinik und Poliklinik A der Universität Düsseldorf